

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: IMPLANTODONTIA

**MEIO CONDICIONADO DE OSSO
DESMINERALIZADO E LIOFILIZADO ALTERA A
EXPRESSÃO GÊNICA DE FIBROBLASTOS ORAIS
VIA RECEPTORES TGF- β IN VITRO**

GUENTHER SCHULDT FILHO

FLORIANÓPOLIS
2016

GUENTHER SCHULDT FILHO

**MEIO CONDICIONADO DE OSSO
DESMINERALIZADO E LIOFILIZADO ALTERA A
EXPRESSÃO GÊNICA DE FIBROBLASTOS ORAIS
VIA RECEPTORES TGF- β IN VITRO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação
em Odontologia do Centro de Ciências da Saúde
da Universidade Federal de Santa Catarina,
como requisito parcial para obtenção do título de
Doutor em Odontologia. Área de Concentração:
Implantodontia

Orientador: Prof. Dr. Marco Aurélio Bianchini
Co-orientador: Prof. Dr. Reinhard Gruber

FLORIANÓPOLIS
2016

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Schuldt Filho, Guenther

Meio condicionado de osso desmineralizado e liofilizado altera a expressão gênica de fibroblastos orais via receptores TGF- β in vitro : meio condicionado de osso desmineralizado e liofilizado ativa a sinalização de TGF- β / Guenther Schuldt Filho ; orientador, Marco Aurélio Bianchini ; coorientador, Reinhard Gruber. - Florianópolis, SC, 2016.

111 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências da Saúde. Programa de Pós Graduação em Odontologia.

Inclui referências

1. Odontologia. 2. Transplante ósseo. 3. Liofilização. 4. Osso e ossos. 5. Proteínas da superfamília TGF- β . I. Bianchini, Marco Aurélio. II. Gruber, Reinhard. III. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós Graduação em Odontologia. IV. Título.

GUENTHER SCHULDT FILHO

**MEIO CONDICIONADO DE OSSO
DESMINERALIZADO E LIOFILIZADO ALTERA A
EXPRESSÃO GÊNICA DE FIBROBLASTOS ORAIS
VIA RECEPTORES TGF- β IN VITRO**

Esta tese foi julgada adequada para obtenção do grau de Doutor em Odontologia, área de concentração Implantodontia, e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-graduação em Odontologia da Universidade Federal de Santa Catarina.

Florianópolis, 29 de fevereiro de 2016.

Profa. Dra. Izabel Cristina Santos Almeida
Coordenadora do Programa de Pós-graduação em Odontologia

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Marco Aurélio Bianchini
Orientador

Profa. Dra. Tatiana Miranda Deliberador
Universidade Positivo

Prof. Dr. Nilton De Bortoli Júnior
Universidade Paulista

Prof. Dr. Naudy Brodbeck May
Universidade do Sul de Santa Catarina

Prof. Dr. Ricardo de Souza Magini
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Dr. César Augusto Magalhães Benfatti
Universidade Federal de Santa Catarina

Dedico esta tese,

*A minha esposa Daniela, pelos momentos vividos até agora.
Ao meu pai Guenther, por ser minha fonte de inspiração.
A minha mãe Cléa, por ser o grande pilar de nossa família.
Ao meu irmão Guilherme, pois amor de irmão é único.*

Amo vocês!

“A melhor coisa que você pode fazer por uma pessoa é inspirá-la.”

(Bob Dylan)

AGRADECIMENTOS

A minha esposa Daniela, pela paciência, cumplicidade, amizade, e pelos inesquecíveis momentos vividos na Europa durante o período de Doutorado sanduíche. Eu te amo.

Ao meu orientador, Professor Marco Aurélio Bianchini, por ter acreditado em mim num momento em que muitos duidavam. Serei grato a ti por toda minha vida.

À empresa Implacil De Bortoli, em nome dos Professores Nilton De Bortoli Júnior e Mário Sérgio De Bortoli. Obrigado pelo apoio e confiança, e pela oportunidade de trabalho com pesquisa clínica.

Ao meu co-orientador austríaco Professor Reinhard Gruber, por ter me ensinado a dar os primeiros passos na pesquisa básica e por toda sua receptividade nas cidades de Berna e Viena.

Aos professores Ricardo de Souza Magini, Cesar Augusto Magalhães Benfatti e Antônio Carlos Cardoso, pelas oportunidades, críticas e incentivos que possibilitaram minha evolução como pessoa e como aluno de pós-graduação.

Aos colegas Jordi Caballé-Serrano, Kosaku Sawada, Younes El-Fersioui e Jöel Beyeler, pela amizade durante minha permanência na Universidade de Berna.

Às funcionárias da UFSC e do CEPID e a todas as pessoas que de alguma forma contribuíram para que esse momento fosse concretizado. Muito obrigado pela ajuda e atenção de vocês.

SCHULDT FILHO, Guenther. Meio condicionado de osso desmineralizado e liofilizado altera a expressão gênica de fibroblastos orais via receptores TGF- β in vitro. **2016. 111p. Tese (Doutorado em Odontologia – Área de Concentração em Implantodontia) – Programa de Pós Graduação em Odontologia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Brasil.**

RESUMO

Histórico: A matriz óssea desmineralizada (MOD) é utilizada para o tratamento de defeitos ósseos. O meio condicionado obtido a partir de partículas ósseas de origem autógena tem o potencial de ativar a sinalização do fator de crescimento transformador- β (TGF- β) em células mesenquimais. O objetivo deste estudo foi determinar se o processamento do osso autógeno em MOD afeta a atividade do meio condicionado. **Métodos:** Blocos corticais suínos foram submetidos ao desgorduramento, à desmineralização com diferentes concentrações de ácido clorídrico (HCl), e a diferentes temperaturas durante sua etapa de preparo. Posteriormente, o osso foi liofilizado e particulado até a obtenção da matriz óssea desmineralizada. Fibroblastos gengivais e do ligamento periodontal foram expostos ao meio condicionado obtido a partir da matriz óssea desmineralizada (MOCD). Alterações na expressão dos genes alvos do fator de crescimento transformador- β foram determinados. **Resultados:** O MOCD alterou consideravelmente a expressão dos genes alvos (ADM, PTX3, KANK4, IL11, NOX4, e BTBD11). Esta resposta foi observada nos fibroblastos gengivais e do ligamento periodontal. A etapa de desgorduramento diminuiu a atividade do MOCD. O inibidor seletivo SB431542 de receptores TGF- β bloqueou os efeitos do MOCD sobre a expressão gênica. No entanto a dorsomorfina, inibidora seletiva dos receptores da proteína óssea morfogenética (BMP), não teve efeito semelhante. O meio ósseo condicionado obtido a partir da MOD comercial humana, também alterou a expressão gênica. **Conclusão:** Os achados sugerem que o meio condicionado obtido a partir da matriz óssea desmineralizada pode ativar a sinalização do fator de crescimento transformador- β de fibroblastos gengivais e do ligamento periodontal.

Palavras-chave: Osso e ossos. Substitutos ósseos. Transplante ósseo. Meio de cultura condicionado. Liofilização. Proteínas da superfamília TGF- β .

SCHULDT FILHO, Guenther. Conditioned medium of demineralized and freeze-dried bone modulates gene expression in oral fibroblasts via TGF- β receptors in vitro. **2016. 111p. Thesis (PhD in Dentistry – Implant Dentistry) – Graduate Program in Dentistry, Federal University of Santa Catarina, Florianópolis, Brazil.**

ABSTRACT

Background: Demineralized bone matrix (DBM) is used for the treatment of osseous defects. Conditioned medium from native bone chips can activate transforming growth factor- β (TGF- β) signaling in mesenchymal cells. The aim of this study was to determine whether processing of native bone into DBM affects the activity of the conditioned medium. **Methods:** Porcine cortical bone blocks were subjected to defatting, different concentrations of hydrochloric acid (HCl), and various temperatures. DBM was lyophilized, ground, and placed into culture medium. Human gingiva and periodontal fibroblasts were exposed to the respective conditioned medium obtained from DBM (DBCM). Changes in the expression of TGF- β target genes were determined. **Results:** DBCM altered the expression of TGF- β target genes (e.g., adrenomedullin, pentraxin 3, KN motif and ankyrin repeat domains 4, interleukin 11, NADPH oxidase 4, and BTB [POZ] domain containing 11) by at least five-fold. The response was observed in fibroblasts from both sources. Defatting lowered the activity of DBCM. The TGF- β receptor type I kinase inhibitor SB431542 [4-(4 (benzo[d][1,3]dioxol-5-yl)-5-(pyridin-2-yl)-1H-imidazol-2-yl)benzamide] but not the inhibitor of bone morphogenetic protein receptor dorsomorphin, blocked the effects of DBCM on gene expression. Moreover, conditioned medium obtained from commercial human DBM modulated the expression of TGF- β target genes. **Conclusion:** The findings suggest that the conditioned medium obtained from demineralized bone matrix can activate TGF- β signaling in oral fibroblasts.

Key-words: Bone and bones. Bone substitutes. Bone transplantation. Culture media, conditioned. Freeze drying. TGF- β superfamily proteins.

LISTA DE FIGURAS

Do artigo em português

Figura 1: Mandíbula porcina pronta para ser manipulada até a obtenção da matriz óssea desmineralizada.

Figura 2: Teste de von Kossa para confirmar que as amostras estavam completamente desmineralizadas. As áreas mineralizadas apresentam-se negras.

Figura 3: Coloração de Live/Dead. Células vivas estão em verde enquanto células em vermelho estão mortas.

Figura 4: Alterações na expressão dos genes regulados pelo TGF- β sobre fibroblastos gengivais (A e B) e células do ligamento periodontal (C e D) durante a exposição com MOCD, tendo sido considerado a temperatura durante a etapa de desmineralização. RT = temperatura ambiente.

Figura 5: Alterações na expressão dos genes regulados pelo TGF- β sobre fibroblastos gengivais (A e B) e células do ligamento periodontal (C e D) durante a exposição com MOCD, tendo sido considerado a concentração de ácido clorídrico (0.5M a 2M) durante a etapa de desmineralização (24 horas) sob temperatura ambiente.

Figura 6: Alterações na expressão dos genes regulados pelo TGF- β sobre fibroblastos gengivais e células do ligamento periodontal. Linhas verde, roxa e vermelha representam três diferentes doadores de fibroblastos gengivais. Linhas laranja, azul clara e azul escura representam três diferentes doadores de células do ligamento periodontal. As células foram estimuladas com MOCD que sofreram ou não desengorduramento com acetona e metanol (1:1).

Figura 7: Alterações na expressão de marcadores de diferenciação de células ST2 durante a exposição com MOCD porcina e MOD comercial humana (cDBM) durante 72 horas (A). Azul representa a coloração histoquímica da fosfatase alcalina (B). AP = fosfatase alcalina.

Do artigo em inglês

Figure 1: Porcine mandible used for obtaining demineralized bone matrix.

Figure 2: Von Kossa staining to determine mineralization. Mineralized areas appeared black.

Figure 3: Live-Dead staining. Viable cells appear green and dead cells are red.

Figure 4: X-fold changes on expression of TGF- β regulated genes in gingival fibroblasts (A and B) and PDL cells (C and D) during exposure to DBCM with regard to the temperature during bone demineralization. RT = room temperature.

Figure 5: X-fold changes on expression of TGF- β regulated genes in gingival fibroblasts (A and B) and PDL cells (C and D) during exposure to DBCM with regard to the concentration of hydrochloric acid (0.5M to 2M) during bone demineralization (24 hours) at room temperature.

Figure 6: X-fold changes on expression of TGF- β regulated genes based on data from gingival and PDL fibroblasts. Green, purple and red lines represent three different donors of gingival fibroblast. Orange, light and dark blue lines represent PDL fibroblasts. Cells were exposed to DBCM with and without previous defatting step with acetone and methanol (1:1).

Figure 7: X-fold changes on expression of differentiation markers in ST2 cells during exposure to porcine DBCM and commercial human DBM (represented as cDBM) for 72 hours (A). Blue represents the histochemical staining of ALP (B). Original magnification x10. AP = alkaline phosphatase.

Do apêndice

Figura 1: Exakt, Norderstedt, Germany. Equipamento utilizado para seccionar a mandíbula porcina.

Figura 2: Varicut 50, Leco, St. Joseph, MI, USA. Equipamento utilizado para preparo das amostras com espessura de 3mm e 10mm de comprimento.

Figura 3: RC 10.22, Jouan, Saint-Herblain, France. Equipamento utilizado para liofilização das amostras com espessura de 3mm e 10mm de comprimento.

Figura 4: R. Quétin Bone-Mill, R. Quétin, Leimen, Germany. Equipamento utilizado para particular o osso liofilizado.

LISTA DE TABELAS

Do artigo em português

Tabela 1: Efeito dos inibidores de receptores de BMP's e TGF- β . Dorsomorfina, inibidor seletivo de BMP's, não bloqueou os efeitos do MOCD sobre a expressão gênica. Valores mostrados são relacionados com o grupo controle de fibroblastos não estimulados. *P <0.05 (teste t).

Tabela 2: Efeito do meio ósseo condicionado de humanos e do meio ósseo condicionado porcino. Valores representam os dados de dois experimentos independentes. Valores mostrados são relacionados com o grupo controle de fibroblastos não estimulados. Os dados são descritivos; análise estatística não realizada.

Do artigo em inglês

Table 1: Effect of inhibitors of BMP and TGF- β receptors - Dorsomorphin, the inhibitor of BMPRs, did not block the effects of DBCM on gene expression. Values shown are fold changes compared to unstimulated oral fibroblast controls. *P <0.05 compared to DBCM based on paired t test.

Table 2: Effect of conditioned medium from human DBM and porcine DBM - Values represent the data from two independent experiments. Shown fold changes compared to unstimulated oral fibroblast controls. The data are descriptive; no statistical analysis was performed.

LISTA DE GENES

ADM (**Adrenomedulina**)

GGACATGAAGGGTGCCTCTC- TG TTCATGCTCTGGCGGTAG

PTX3 (**Pentraxina 3**)

TGTATGTGAATTTGGACAACGAA-CATTCCGAGTGCTCCTGAC

BTBD11 (**BTB [POZ] domain containing 11**)

CAAAGCACTCCTCTCCAGCA-AATGAGCAGTGACTCTGGGC

IL11 (**Interleucina 11**)

TGCACCTGACACTTGACTGG-AGTCTTCAGCAGCAGCAGTC

NOX4 (**NADPH oxidase 4**)

TCTTGGCTTACCTCCGAGGA-CTCCTGGTTCTCCTGCTTGG

KANK4 (**KN motif and ankyrin repeat domains 4**)

GAACCGAGGAACTGG-CCTCTTCCTGCTGCT

B-ACTIN (**Beta-Actina**)

CCAACCGCGAGAAGATGA-CCAGAGGCGTACAGGGATAG

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIACÕES

- ** - Açougue Balsiger, Wattenwil, Switzerland.
- †† - Exakt, Norderstedt, Germany.
- ‡‡ - Varicut 50, Leco, St. Joseph, MI, USA.
- §§ - RC 10.22, Jouan, Saint-Herblain, France.
- ii - R. Quétin Bone-Mill, R. Quétin, Leimen, Germany.
- ¶¶ - Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Carlsbad, CA, USA.
- ## - AlloFuse Donor 113521, AlloSource, Centennial, CO, USA.
- *** - Allobone Spongiosa Neutromedics, Cham, Switzerland.
- ††† - RIKEN Cell Bank, Tsukuba, Japan.
- ‡‡‡ - Enzo Life Sciences, Lausen, Switzerland.
- §§§ - Calbiochem, Merck, Billerica, MA, USA.
- iii - High Pure RNA Isolation Kit, Hoffmann-La Roche, Basel, Switzerland.
- ¶¶¶ - Transcriptor Universal cDNA Master Mix, Hoffmann-La Roche, Basel, Switzerland.
- ### - FastStart Universal SYBR Green Master Mix, Hoffmann-La Roche, Basel, Switzerland.
- **** - 7500 Real-Time PCR System, Applied Biosystems, Life Technologies, Thermo Fisher Scientific, Carlsbad, CA, USA.
- †††† - Sigma-Aldrich, St. Louis, MI, USA.
- ‡‡‡‡ - DFC420 C, Leica, Wetzlar, Germany.

HCl: Ácido clorídrico.

M: Mol – Unidade de quantidade de substância utilizada na química.

MOD: Matriz óssea desmineralizada.

MOCD: Meio ósseo condicionado e desmineralizado.

TGF-β: Fator de crescimento transformador – β.

BMP: Proteína óssea morfogenética.

SB431542: Inibidor seletivo de receptores de TGF-β.

LDN193189: Inibidor seletivo de receptores de BMP.

DMEM: Meio Eagle Modificado por Dulbecco.

µg: Microgramas.

ml: Mililitros.

U: Unidades, sendo que 100U correspondem a 1ml.

ST2: Linhagem de células pré-osteoblástica.

cDBM: Matriz óssea desmineralizada humana comercializada.

AP: Fosfatase alcalina.

SUMÁRIO

Capítulo I	29
1.1 INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA.....	31
Capítulo II	33
2.1 ARTIGO CIENTÍFICO EM PORTUGUÊS.....	35
2.2 MANUSCRIPT.....	57
2.3 ARTIGO ACEITO PARA PUBLICAÇÃO	79
Capítulo III	89
3.1 BIBLIOGRAFIA CONSULTADA	91
Capítulo IV	95
4.1 ARTIGOS PUBLICADOS DURANTE O DOUTORADO.....	97
4.2 ARTIGOS ACEITOS PARA PUBLICAÇÃO DURANTE O DOUTORADO.....	100
4.3 CAPÍTULO DE LIVRO PUBLICADO DURANTE O DOUTORADO.....	100
4.4 PARTICIPAÇÃO EM BANCAS DE MONOGRAFIA DE ESPECIALIZAÇÃO	101
4.5 PARTICIPAÇÃO EM BANCA DE TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO	101
Capítulo V.....	103
APÊNDICE	105
5.1 APARELHOS UTILIZADOS PARA O PREPARO DAS AMOSTRAS.....	105
5.2 METODOLOGIA EXPANDIDA	109

Capítulo I

1.1 INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA

A matriz óssea desmineralizada (MOD) é amplamente utilizada como material de preenchimento em cirurgias buco-maxilo faciais, periodontia e ortopedia (BIANCHINI et al., 2009; GRUSKIN et al., 2012; TILKERIDIS et al., 2014). Atualmente, cerca de 20% do mercado utiliza a matriz óssea desmineralizada para tratamento de defeitos ósseos (GRUSKIN et al., 2012).

Essa matriz é basicamente constituída por proteínas colágenas insolúveis, em sua maior parte colágeno tipo I, seguido pelos tipos IV e X. Proteínas não-colágenas, fatores de crescimento, quantidade variável de cálcio residual e restos celulares, completam sua composição (GRUSKIN et al., 2012).

A MOD possui potencial osteoindutor e osteocondutor e como propriedades, pode-se citar a biocompatibilidade, biodegradabilidade, fácil obtenção, esterilizável e fácil armazenamento. Inerentes aos enxertos alógenos, as propriedades osteoindutoras da matriz óssea desmineralizada, dentre as quais pode-se citar a capacidade de formação óssea ectópica, são mantidas após o processamento do osso nativo (URIST, 1965).

Ainda, é considerada clinicamente superior aos enxertos alógenos frescos por causa do processo de desmineralização pela qual é submetida, destruindo assim substâncias que podem levar a algum tipo de resposta imunológica (URIST, 1965; URIST & NOGAMI, 1970). Esta desmineralização tem como objetivo a eliminação do cálcio residual para facilitar a obtenção e potencializar a ação das proteínas ósseas morfogenéticas (BMPs) (URIST, 1965; URIST & STRATES, 1971). Isto deve-se ao fato de que a quantidade disponível de BMP é inversamente proporcional à quantidade de cálcio residual (HONSAWEK et al., 2005).

A etapa de desmineralização consiste na remoção da parte mineral do osso, com a utilização de ácido clorídrico, e dos lipídios, utilizando-se acetona e metanol (GRUSKIN et al., 2012). Mesmo após este tipo de tratamento, as proteínas responsáveis pelas propriedades osteoindutoras da MOD, conhecidas como proteínas ósseas morfogenéticas (BMPs), permanecem na matrix extracelular (REDDI, 2001).

Estes achados não descartam que outras moléculas liberadas pela MOD contribuam para a consolidação do enxerto, processo considerado complexo que segue os princípios da formação óssea endocondral e intra-membranosa (ZELZER & OLSEN, 2003). O osso desmineralizado

e processado é diferente dos osso recém removido e particulado. Este último contém células viáveis e não é submetido a nenhum tipo de processamento, além de ser basicamente constituído por osteócitos (SPRINGER et al., 2004).

Recentemente, os osteócitos foram descritos como espetaculares pelo fato de controlarem a remodelação óssea e por possuírem funções endócrinas essenciais (BONEWALD, 2011; MANOLAGAS & PARFITT, 2013). O osso fresco libera esclerotina e o fator de crescimento-23 de fibroblastos, ambos secretados pelos osteócitos (BROLESE et al., 2014).

Além disso, o meio condicionado obtido a partir do osso fresco (meio ósseo condicionado) contém diversas proteínas (CABALLÉ-SERRANO et al., 2014) e estimula a expressão gênica de células mesenquimais, envolvendo especialmente o fator de crescimento transformador- β (PENG et al., 2014; ZIMMERMANN et al., 2015).

Dentre os genes que sofrem maior alteração estão a adrenomedulina (ADM), pentraxina (PTX)3, KN motif and ankyrin repeat domains (KANK)4, interleucina (IL)11, NADPH oxidase (NOX)4, e BTB (POZ) domain containing 11 (BTBD11) (ZIMMERMANN et al., 2015). Informações adicionais para esta hipótese são obtidas a partir de estudos in vitro que reportam o potencial osteogênico (BECERRA et al., 1996; MURPHY et al., 2013) da matriz óssea desmineralizada e também sua capacidade proliferativa de células mesenquimais (ADKISSON et al., 2000).

Por este motivo, sugere-se que a matriz óssea desmineralizada também pode liberar moléculas capazes de alterar a expressão gênica de células mesenquimais. A hipótese levantada é saber se o meio condicionado obtido a partir da matriz óssea desmineralizada (MOCD) possui capacidade semelhante à do osso fresco (CABALLÉ-SERRANO et al., 2014; PENG et al., 2014; ZIMMERMANN et al., 2015) de provocar significativas alterações na expressão gênica de células mesenquimais.

Por isso, o objetivo do presente estudo foi realizar um ensaio biológico in vitro com o meio condicionado obtido a partir da matriz óssea desmineralizada.

Capítulo II

2.1 ARTIGO CIENTÍFICO EM PORTUGUÊS

O artigo a seguir está formatado de acordo com as normas para publicação da revista científica *Journal of Periodontology*. Fator de impacto: **2.706**. Qualis: **A1**.

Meio condicionado de osso desmineralizado e liofilizado ativa a expressão gênica de fibroblastos periodontais in vitro.

Guenther Schuldt Filho^{**†‡}, Jordi Caballé-Serrano^{**§}, Kosaku Sawada^{*i}, Dieter D. Bosshardt^{†¶}, Marco Aurélio Bianchini[‡], Daniel Buser[†] e Reinhard Gruber^{*†#}

Autor para correspondência: Reinhard Gruber, PhD; Laboratory of Oral Cell Biology, School of Dental Medicine, University of Bern, Freiburgstrasse 7, 3010 Bern, Switzerland; Email: reinhard.gruber@zmk.unibe.ch

Fontes de apoio: Guenther Schuldt Filho possui apoio financeiro da CAPES, Brasília, Brasil; Jordi Caballé-Serrano possui apoio financeiro da Fundação de Pesquisa e Educação Dental, Basel, Suíça.

Palavras-chave: Osso e ossos. Substitutos ósseos. Transplante ósseo. Meio de cultura condicionado. Liofilização. Proteínas da superfamília TGF- β .

Título curto: MOCD ativa a sinalização via receptores TGF- β

* Laboratory of Oral Cell Biology, School of Dental Medicine, University of Bern, Bern, Switzerland.

† Department of Oral Surgery and Stomatology, School of Dental Medicine, University of Bern.

‡ Department of Implant Dentistry, Federal University of Santa Catarina, Florianópolis, Brazil.

§ Department of Oral and Maxillofacial Surgery, College of Dentistry, Universitat Internacional de Catalunya, Barcelona, Spain.

i Department of Cranio-Maxillofacial Surgery, Inselspital, University of Bern.

¶ Robert K. Schenk Laboratory of Oral Histology, School of Dental Medicine, University of Bern.

Department of Oral Biology, Medical University of Vienna, Vienna, Austria.

RESUMO

Histórico: A Matriz óssea desmineralizada (MOD) é utilizada para o tratamento de defeitos ósseos. O meio condicionado obtido a partir de partículas ósseas de origem autógena tem o potencial de ativar a sinalização do fator de crescimento transformador- β (TGF- β) em células mesenquimais. O objetivo deste estudo é determinar se o processamento do osso autógeno em MOD afeta a atividade do meio condicionado.

Métodos: Para isso, blocos corticais suínos foram submetidos ao desgorduramento, à desmineralização com diferentes concentrações de ácido clorídrico (HCl), e a diferentes temperaturas durante sua etapa de preparo. Posteriormente, o osso foi liofilizado e particulado até a obtenção da matriz óssea desmineralizada. Fibroblastos gengivais e do ligamento periodontal foram expostos ao meio condicionado obtido a partir da matriz óssea desmineralizada (MOCD). Alterações na expressão dos genes alvos do fator de crescimento transformador- β foram determinados. **Resultados:** O MOCD alterou consideravelmente a expressão dos genes alvos (ADM, PTX3, KANK4, IL11, NOX4, e BTBD11). Esta resposta foi observada nos fibroblastos gengivais e do ligamento periodontal. A etapa de desgorduramento diminuiu a atividade do MOCD. O inibidor seletivo SB431542 de receptores TGF- β bloqueou os efeitos do MOCD sobre a expressão gênica. No entanto a dorsomorfina, inibidora seletiva dos receptores da proteína óssea morfogenética (BMP), não teve efeito semelhante. O meio ósseo condicionado obtido a partir da MOD comercial humana, também alterou a expressão gênica. **Conclusão:** Os achados sugerem que o meio condicionado obtido a partir da matriz óssea desmineralizada pode ativar a sinalização do fator de crescimento transformador- β de fibroblastos gengivais e do ligamento periodontal.

Palavras-chave: Osso e ossos. Substitutos ósseos. Transplante ósseo. Meio de cultura condicionado. Liofilização. Proteínas da superfamília TGF- β .

INTRODUÇÃO

A matriz óssea desmineralizada (MOD) é amplamente utilizada como material de preenchimento em cirurgias buco-maxilo faciais, periodontia e ortopedia.¹⁻³ Esta matriz é constituída por proteínas colágenas insolúveis e não colágenas, além de possuir propriedades osteocondutoras e osteoindutoras. As propriedades osteoindutoras da matriz óssea desmineralizada, dentre as quais pode-se citar a capacidade de formação óssea ectópica, são mantidas após o processamento do osso removido da espécie doadora.⁴

O processamento consiste na remoção da parte mineral do osso, com a utilização de ácido clorídrico, e também na remoção dos lipídios, utilizando-se acetona e metanol.¹ As proteínas responsáveis pelas propriedades osteoindutoras da MOD, conhecidas como proteínas ósseas morfogenéticas (BMPs), permanecem na matrix extracelular mesmo após esse tipo de processamento.⁵ Estes achados não descartam que outras moléculas liberadas pela MOD contribuam para a consolidação do enxerto ósseo, processo considerado complexo que segue os princípios da formação óssea endocondral e intra-membranosa.⁶

O osso desmineralizado e processado é diferente do osso recém removido e particulado. Este último contém células viáveis,⁷ constituído principalmente por osteócitos. Recentemente, os osteócitos foram descritos como espetaculares pelo fato de controlarem a remodelação óssea e por possuírem funções endócrinas essenciais.^{8,9} O osso fresco libera esclerotina e o fator de crescimento-23 de fibroblastos, ambos secretados pelos osteócitos.¹⁰

Além disso, o meio condicionado obtido a partir do osso fresco (meio ósseo condicionado) contém diversas proteínas¹¹ e estimula a expressão gênica de células mesenquimais, envolvendo especialmente o fator de crescimento transformador- β (TGF- β).^{12,13} Dentre os genes que sofrem maior alteração, pode-se citar a adrenomedulina (ADM), pentraxina 3 (PTX3), KN motif and ankyrin repeat domains 4 (KANK4), interleucina 11 (IL11), NADPH oxidase 4 (NOX4), e BTB (POZ) domain containing 11 (BTBD11).¹³ Informações adicionais para esta hipótese são obtidas a partir de estudos *in vitro* que reportam o potencial osteogênico^{14,15} da matriz óssea desmineralizada e também sua capacidade de proliferação de células mesenquimais.¹⁶

Por este motivo, sugere-se que a matriz óssea desmineralizada também pode liberar moléculas capazes de alterar a expressão gênica de células mesenquimais. A hipótese levantada é saber se o meio condicionado obtido a partir da matriz óssea desmineralizada (MOCD)

possui capacidade semelhante ao do osso fresco¹¹⁻¹³ de provocar significativas alterações na expressão gênica de células mesenquimais, como descrito anteriormente.

Por isso, o objetivo do presente estudo é realizar um ensaio biológico *in vitro* com o meio condicionado obtido a partir da matriz óssea desmineralizada.

MATERIAIS E MÉTODOS

Desmineralização da matriz óssea

O osso porcino (Figura 1) foi obtido de um açougue local^{**} seis horas após o animal ter sido sacrificado, e mantido congelado (-20°C). Com o uso de uma serra diamantada,^{††} blocos corticais foram preparados utilizando-se apenas a porção vestibular do osso. Assim, foram obtidos blocos com 3mm de espessura e 10mm de comprimento.^{‡‡}

Após esta primeira etapa, os blocos foram submetidos aos seguintes tratamentos: 1) desengorduramento com acetona e metanol (1:1) ou não; 2) desmineralização com ácido clorídrico a 0.5, 1, e 2M; e 3) desmineralização realizada a 4°C ou a temperatura ambiente. O ácido residual foi eliminado com o uso de água destilada durante 30 minutos de lavação vigorosa.



Figura 1: Mandíbula porcina pronta para ser manipulada até a obtenção da matriz óssea desmineralizada.

Na sequência, os blocos foram liofilizados^{§§} e particuladosⁱⁱ para obtenção da “matriz óssea desmineralizada”. O teste de coloração von Kossa (Figura 2) foi realizado para confirmar que as amostras estavam completamente desmineralizadas. Em resumo, para análise histológica as amostras foram preparadas com o uso de um micrótomo, embebidas em nitrato de sódio e expostas à luz solar. As áreas mineralizadas mostravam-se negras ao microscópio.

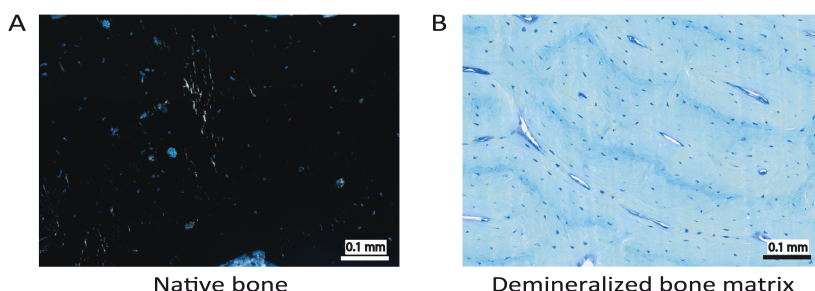


Figura 2: Teste de von Kossa para confirmar que as amostras estavam completamente desmineralizadas. As áreas mineralizadas apresentam-se negras.

Preparo do Meio Ósseo Condicionado e Desmineralizado (MOCD)

A matriz óssea desmineralizada (10%) foi colocada em meio contendo DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium), com 100U/ml de penicilina, 100µg/ml de estreptomicina e 0.25µg/ml de anfotericina.^{¶¶} Durante o período de 24 horas, o meio foi mantido em temperatura ambiente numa misturadora. O MOCD foi então filtrado e mantido congelado (-20°C) em alíquotas. Antes do uso, as alíquotas eram devidamente descongeladas em água previamente aquecida. A extração dos lipídios foi devidamente realizada com o uso de metanol/clorofórmio.¹⁷ Para os experimentos, preparações comerciais (putty^{###} e pó^{***}) de matriz óssea humana desmineralizada foram igualmente realizadas.

Células mesenquimais primárias e linhagens celulares

Fibroblastos gengivais e do ligamento periodontal foram obtidos a partir da coleta de tecido mole de dois doadores independentes durante a cirurgia de extração de terceiros molares. Ambos os pacientes estavam

cientes da remoção e assinaram o termo livre de consentimento esclarecido previamente à coleta tecidual. O comitê de ética do Cantão de Berna aprovou o protocolo. A linhagem de células mesenquimais ST2 foi obtida a partir de um banco de células.^{†††} Todas as células foram cultivadas num ambiente umidificado (37°C) de meio de crescimento contendo DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium), soro fetal bovino 10% e antibióticos. As células foram semeadas em placas de cultura contendo meio de crescimento (30.000 células/cm²) e mantidas por 24 horas. Então, as células foram expostas a 20% de MOCD. Para o grupo controle, o meio de cultura livre de soro foi diluído no meio de crescimento.

O teste de viabilidade celular baseou-se na coloração Live/Dead (Figura 3).^{†††} A análise da expressão gênica foi realizada após 24 horas de incubação. A análise histoquímica da fosfatase alcalina em células ST2 foi realizada após 72 horas de incubação. Para os experimentos indicados, os seguintes inibidores farmacológicos seletivos foram utilizados: SB431542^{§§§} (inibidor seletivo de receptores TGF- β) e dois inibidores específicos de receptores de BMP tipo I: Dorsomorfina e LDN193189, os quais inibem principalmente ALK2 e ALK3 mas também ALK4, ALK5, e ALK7.

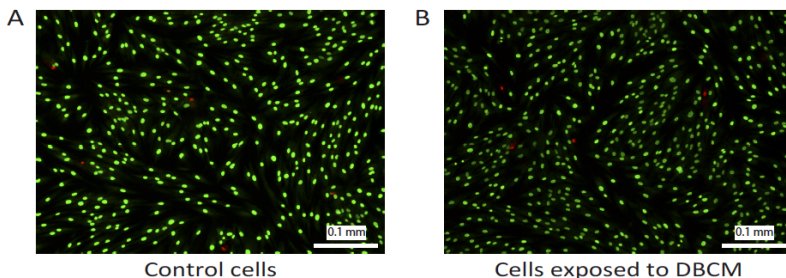


Figura 3: Coloração de Live/Dead. Células vivas estão em verde enquanto células em vermelho estão mortas.

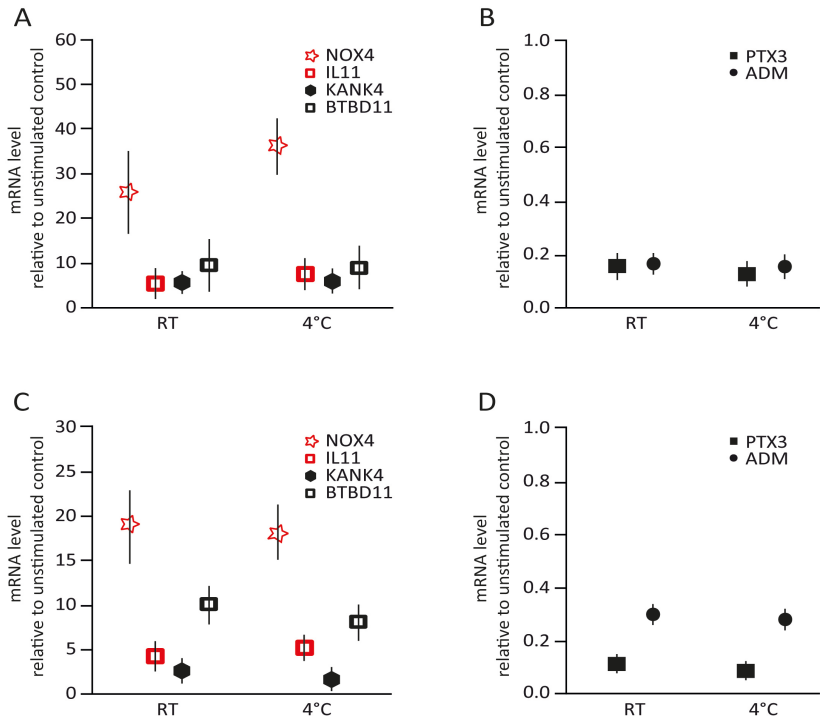


Figura 4: Alterações na expressão dos genes regulados pelo TGF- β sobre fibroblastos gengivais (A e B) e células do ligamento periodontal (C e D) durante a exposição com MOCD, tendo sido considerado a temperatura durante a etapa de desmineralização. RT = temperatura ambiente.

Análise da transcrição reversa quantitativa - reação em cadeia da polimerase (PCR)

Para a análise da expressão gênica, o RNA celular foi isolado.ⁱⁱⁱ A transcrição reversa foi realizada com o cDNA master mix,^{iv} e a reação em cadeia da polimerase (PCR) foi feita com o green master mix^{####} em um sistema de PCR em tempo real.^{****} Os genes analisados foram

hADM: GGACATGAAGGGTGCCTCTC-TGTTTCATGCTCTGGCGGTAG; hPTX3: TGTATGTGAATTTGGACAACGAA - CATTCCGAGTGCTCCTGAC; hBTBD11: CAAAGCACTCCTCTCCAGCA - AATGAGCAGTGACTCTGGGC; hIL11: TGCACCTGACACTTGACTGG -

AGTCTTCAGCAGCAGCAGTC; hNOX4:
 TCTTGGCTTACCTCCGAGGA - CTCCTGGTTCTCCTGCTTGG;
 hKANK4: GAACCGAGGAACTGG - CCTCTTCCTGCTGCT; e hβ-
 actina: CCAACCGCGAGAAGATGA -
 CCAGAGGCGTACAGGGATAG. Os níveis de mRNA foram
 calculados após a normalização com o gene-referência β-actina
 utilizando-se o método de ciclo comparativo.

Fosfatase alcalina

Para análise histoquímica da fosfatase alcalina, células da linhagem ST2 foram fixadas e incubadas em uma solução contendo naftol AS-TR fosfato e sal diazônico (fast blue BB).^{††††} Após lavagem com água destilada, as culturas foram fotografadas.^{††††18}

Análises estatísticas

Todos os experimentos foram realizados em duplicatas ou triplicatas. Os dados foram reportados como médias +/- desvio padrão. O teste t pareado foi utilizado em experimentos com variação de temperatura (desengorduramento versus não-desengorduramento a 4°C ou temperatura ambiente). A análise de variância foi usada para comparar as três concentrações de ácido clorídrico. A significância estatística foi estabelecida como $P < 0.05$.

RESULTADOS

A desmineralização foi obtida com êxito e os fibroblastos expostos ao MOCD estavam viáveis

Para a confirmação da desmineralização, o teste de coloração von Kossa foi realizado. A desmineralização com HCl 1M em temperatura ambiente fez com que as estruturas ósseas corticais ficassem expostas. Por outro lado, o osso não desmineralizado (nativo) estava com coloração negra. Para descartar qualquer efeito adverso do MOCD, a coloração Live/Dead foi realizada. Este teste demonstrou as células viáveis em verde e as células mortas em vermelho. Fibroblastos gengivais expostos ao MOCD 20% durante 24 horas permaneceram viáveis.

Fibroblastos orais respondem ao MOCD preparado sob diferentes temperaturas, concentrações de HCl e desengorduramento.

Na sequência, o efeito da temperatura durante a desmineralização do osso porcino foi avaliado. Em fibroblastos gengivais (Figuras 4A e 4B) e do ligamento periodontal (Figuras 4C e 4D), o MOCD preparado em temperatura ambiente ou a 4°C com HCl 1M provocou aumento similar na expressão dos genes BTBD11, IL11, KANK4, e NOX4 e diminuição similar na expressão gênica de ADM e PTX3.

Para melhor entendimento da influência da etapa de desmineralização na bioatividade do MOCD, o osso porcino foi submetido à incubação com HCl 0.5M e 2M em temperatura ambiente. A figura 5 mostra que o MOCD preparado com qualquer das três concentrações alterou similarmente a expressão gênica de fibroblastos gengivais e periodontais. No entanto, a etapa de desengorduramento diminuiu substancialmente o efeito do MOCD sobre os genes IL11 ($P=0.01$) e BTBD11 ($P=0.05$). Similar tendência pode ser observada nos genes NOX4 e KANK4 (Figura 6). A fração de lipídio não teve qualquer influência na expressão gênica.

A resposta de fibroblastos orais ao MOCD requer a sinalização de receptores I de TGF- β

Na continuação, foi investigado se o MOCD possui atividade via receptores TGF- β ou não.^{12,13} O inibidor específico de receptores TGF- β (SB431542) bloqueou significativamente a expressão gênica em fibroblastos gengivais expostos ao MOCD (Tabela 1). O bloqueio farmacológico de receptores de BMP I com o inibidor específico dorsomorfina não teve qualquer efeito na expressão gênica (Tabela 1). LDN193189, um inibidor específico do receptor de TGF- β (ALK5), reduziu significativamente os efeitos do MOCD (Tabela 1).

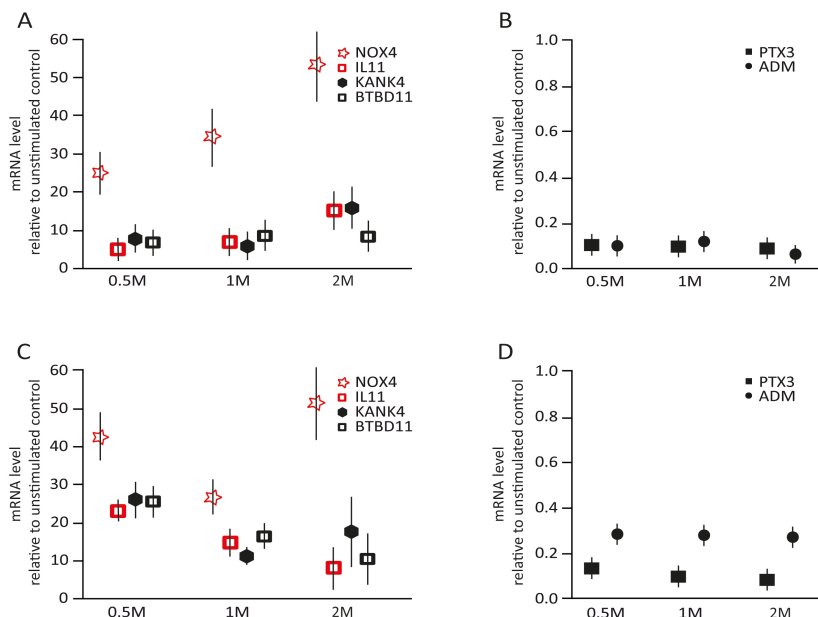


Figura 5: Alterações na expressão dos genes regulados pelo TGF- β sobre fibroblastos gengivais (A e B) e células do ligamento periodontal (C e D) durante a exposição com MOCD, tendo sido considerada a concentração de ácido clorídrico (0.5M a 2M) durante a etapa de desmineralização (24 horas) sob temperatura ambiente.

Fibroblastos orais respondem ao meio condicionado obtido a partir da matriz óssea desmineralizada humana comercial

Para relacionar os dados obtidos da MOD porcina com preparações obtidas da MOD comercial humana, os fibroblastos foram expostos à um meio condicionado igualmente preparado com MOD humana (putty) e MOD humana (pó). O meio condicionado da MOD humana (putty) alterou moderadamente a expressão gênica (Tabela 2). Deve-se salientar que esta alteração foi dependente do inibidor específico SB431542. Ainda, os resultados obtidos da MOD porcina foram mais significativos do que o respectivo meio condicionado obtido a partir da MOD humana (putty).

MOCD diminui a atividade da fosfatase alcalina em células da linhagem pré-osteoblástica ST2

Células da linhagem ST2 foram expostas ao MOCD e a atividade da fosfatase alcalina foi determinada por histoquímica.¹² Após incubação de 72 horas das células ST2 em MOCD, houve uma supressão robusta da atividade da fosfatase alcalina (Figura 7). Achado similar foi observado em meio condicionado da MOD humana (putty).

DISCUSSÃO

Apesar da longa história e do uso global de substitutos ósseos alógenos em diversas áreas da medicina regenerativa,^{1,19} incluindo a periodontia,^{20,21} o potencial parácrino dos materiais alógenos permanecem obscuros. As primeiras tentativas focaram na proliferação e diferenciação das células mesenquimais.¹⁴⁻¹⁶

Esses estudos apoiaram a ideia de que os materiais alógenos possuem uma atividade parácrina, no entanto, ainda não há estudo que comprove geneticamente tal potencial. Alguns genes foram recentemente descritos como fortes reguladores quando fibroblastos orais foram expostos a um meio ósseo condicionado obtido a partir de osso fresco particulado.¹³ Por este motivo, foi pertinente tentar descobrir se a matriz óssea desmineralizada possui tal atividade.

Os resultados do presente estudo mostram que os genes BTBD11, IL11, KANK4, e NOX4 tiveram sua atividade aumentada. Por outro lado, os genes ADM e PTX3 tiveram sua atividade diminuída quando os fibroblastos foram expostos ao MOCD. O desengorduramento alterou a atividade do respectivo MOCD para os genes que tiveram sua atividade aumentada, ao contrário do processamento com diferentes concentrações de HCl ou da alteração de temperatura durante a etapa de desmineralização.

Os dados estão de acordo com trabalhos prévios realizados com osso fresco¹³ e com partículas ósseas termicamente tratadas²². Estes estudos demonstraram que as alterações na expressão gênica são dependentes do receptor I de sinalização do TGF- β . O meio condicionado da MOD humana comercializada (putty) também alterou a expressão gênica. Os dados sugerem que a MOD liofilizada libera moléculas, ainda não totalmente elucidadas, que provocam alteração na expressão gênica via receptores TGF- β .

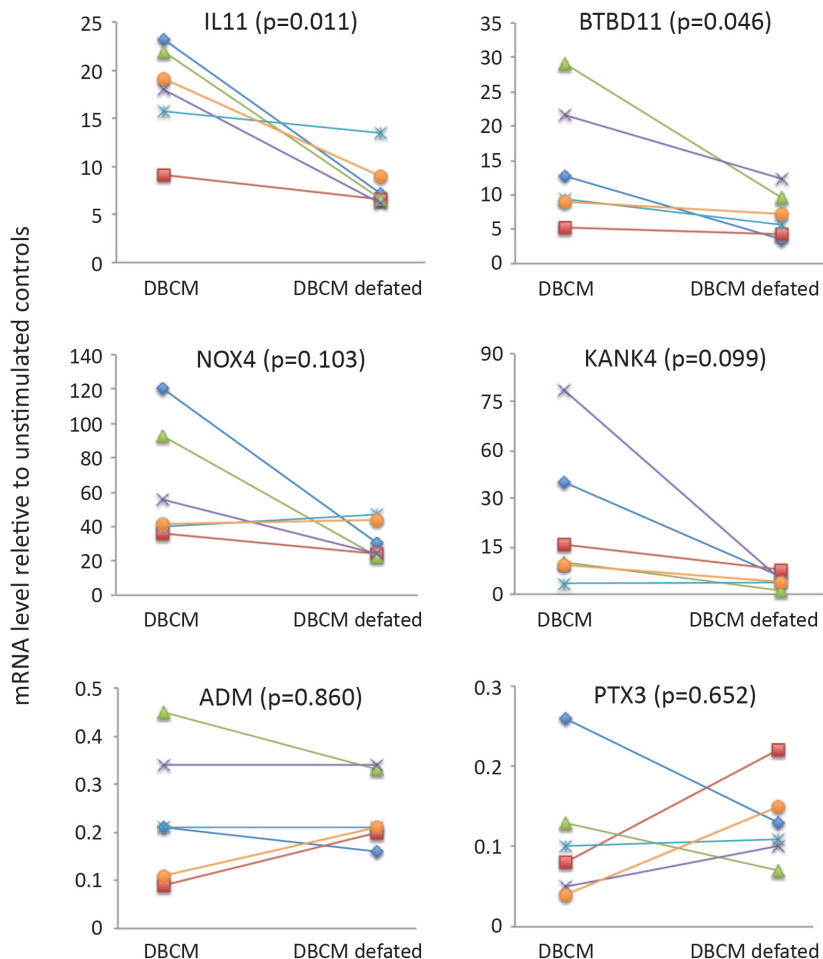


Figura 6: Alterações na expressão dos genes regulados pelo TGF- β sobre fibroblastos gengivais e células do ligamento periodontal. Linhas verde, roxa e vermelha representam três diferentes doadores de fibroblastos gengivais. Linhas laranja, azul clara e azul escura representam três diferentes doadores de células dos ligamento periodontal. As células foram estimuladas com MOCD que sofreram ou não desengorduramento com acetona e metanol (1:1).

	ADM	PTX3	KANK4	IL11	NOX4	BTBD11
DBCM	0.28 ± 0.09	0.15 ± 0.10	24.27 ± 8.17	30.32 ± 20.08	28.92 ± 13.87	6.16 ± 2.41
With dorsomorphin	0.27 ± 0.13	0.08 ± 0.04	19.84 ± 8.91	32.00 ± 16.28	56.71 ± 19.88	9.29 ± 1.46
With LDN193189	0.47 ± 0.21	0.40 ± 0.21	9.97 ± 5.80	9.91 ± 9.97	19.14 ± 10.56	5.23 ± 2.33
With SB431542	0.86 ± 0.280*	1.37 ± 0.09*	1.11 ± 0.36*	0.70 ± 0.10*	1.31 ± 0.47*	0.88 ± 0.33*

Tabela 1: Efeito dos inibidores de receptores de BMP's e TGF-β. Dorsomorfina, inibidor seletivo de BMP's, não bloqueou os efeitos do MOCD sobre a expressão gênica. Valores mostrados são relacionados com o grupo controle de fibroblastos não estimulados. *P <0.05 (teste t).

	ADM	PTX3	KANK4	IL11	NOX4	BTBD11
Gingival fibroblasts						
DBM putty	0.47 ± 0.05	1.42 ± 0.37	4.42 ± 4.94	4.07 ± 2.14	4.01 ± 1.79	4.04 ± 2.75
DBM powder	1.01 ± 0.20	1.48 ± 0.27	1.38 ± 0.16	0.79 ± 0.01	1.23 ± 0.08	0.90 ± 0.25
DBCM	0.07 ± 0.01	0.05 ± 0.01	14.74 ± 3.14	13.28 ± 4.47	56.46 ± 13.62	7.89 ± 4.43
PDL fibroblasts						
DBM putty	0.58 ± 0.01	1.40 ± 0.68	2.07 ± 0.71	2.72 ± 1.29	2.92 ± 0.51	3.26 ± 0.45
DBM powder	0.97 ± 0.19	1.41 ± 0.43	1.60 ± 0.12	0.62 ± 0.18	1.60 ± 0.40	0.86 ± 0.01
DBCM (porcine)	0.30 ± 0.02	0.07 ± 0.00	25.74 ± 12.53	15.58 ± 5.89	65.95 ± 22.64	18.15 ± 5.16

Tabela 2: Efeito do meio ósseo condicionado de humanos e do meio ósseo condicionado porcino. Valores representam os dados de dois experimentos independentes. Valores mostrados são relacionados com o grupo controle de fibroblastos não estimulados. Os dados são descritivos; análise estatística não realizada.

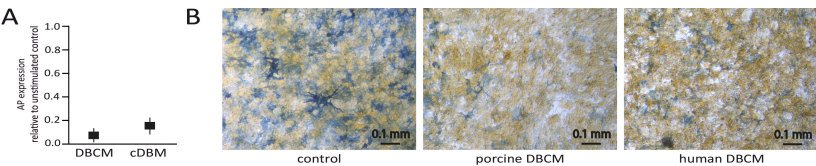


Figura 7: Alterações na expressão de marcadores de diferenciação de células ST2 durante a exposição com MOCD porcina e MOD comercial humana (cDBM) durante 72 horas (A). Azul representa a coloração histoquímica da fosfatase alcalina (B). AP = fosfatase alcalina.

Os presentes dados confirmam a atividade tipo parácrina da MOD liofilizada, a qual provoca alterações na diferenciação e proliferação de células mesenquimais.¹⁴⁻¹⁶ Também foi estabelecido que IL11,²³ NOX4,²⁴ e PTX3²⁵ são regulados conforme a sinalização de receptores

TGF- β . Por outro lado, o TGF- β não teve efeito na expressão do gene ADM em células malignas pulmonares²⁶ ou em células mesangiais.²⁷ Ainda permanece obscuro se os efeitos foram causados pelo TGF- β contido no MOCD ou por outras moléculas que agiram via sinalização do receptor I do TGF- β .

Em sintonia com os presentes dados, o inibidor específico LDN193189 pode inibir ALK5 com IC₅₀ valores de 0.5 μ M.²⁸ Assim, é possível que as alterações observadas com LDN193189 envolvam a sinalização de TGF- β . Considerando que a dorsomorfina não causou alterações na expressão gênica, os dados confirmam a teoria de que o MOCD exerce sua atividade via receptores do TGF- β e não via receptores de BMP.

A relevância clínica dos achados permanecem sob grau de especulação. Ainda não está claro se os mecanismos parácrinos contribuem para o complexo processo de consolidação da área enxertada. De uma maneira geral, os dados sugerem um conceito de que a atividade exercida pelo osso desmineralizado não necessita de viabilidade celular⁹ ou da atividade reabsortiva dos osteoclastos, embora ambos aspectos sejam críticos durante a remodelação óssea e envolvam TGF- β .^{29,30}

Se a atividade encontrada no MOCD distingue os materiais alógenos dos biomateriais ainda está por ser determinada. Os mecanismos moleculares que causam as respostas celulares permanecem não elucidados. Os componentes ativos do MOCD permanecem estáveis sob condições ácidas. O desengorduramento diminuiu a respectiva atividade, no entanto a fração lipídica da MOD não teve efeito sobre a expressão gênica.

Os dados sugerem que a etapa de desengorduramento pode ter desnaturado ou removido os componentes ativos, os quais não são os lipídios. Pelo fato da análise proteômica do meio condicionado de partículas ósseas frescas terem revelado um grande número de proteínas estruturais,¹¹ é possível que componentes da matriz extracelular acumulem no MOCD. Dentro de nosso conhecimento, a análise proteômica do MOCD ainda não foi realizada.

Uma limitação do estudo é a restrita gama de genes utilizados, a qual foi escolhida de acordo com estudo prévio.¹³ Assim, numerosas questões permanecem em aberto e devem ser respondidas por estudos futuros. Os próximos trabalhos deverão focar na resposta de outras células além dos fibroblastos periodontais, tais como células endoteliais e epiteliais. Ainda, futuros estudos deverão revelar o efeito do processamento, porque apenas uma MOD liberou quantidade razoável de moléculas no meio condicionado. Também será válido determinar os

mecanismos de sinalização tanto em nível extracelular como intracelular, e finalmente saber se os achados *in vitro* podem ser traduzidos clinicamente.

Os autores vislumbram um melhor entendimento futuro de como os enxertos ósseos contribuem para a regeneração óssea. Os achados devem ajudar no refinamento para o desenvolvimento e desenho de biomateriais cada vez mais biologicamente ativos.

CONCLUSÃO

Os achados sugerem que o meio condicionado obtido a partir da matriz óssea desmineralizada pode ativar a sinalização do fator de crescimento transformador- β de fibroblastos gengivais e do ligamento periodontal.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a contribuição dos técnicos laboratoriais da Universidade de Berna: Catherine Solioz (Laboratório de Biologia Celular Oral), Monika Aeberhard, Silvia Owusu, e David Reist (Laboratório de Histologia Oral Robert K. Schenk). Os autores agradecem também Walter Hollenstein (Neutromedics, Cham, Suíça) por fornecer o material alógeno humano para os experimentos. Os autores declaram que não há nenhum conflito de interesse relacionado ao estudo.

REFERÊNCIAS

1. Gruskin E, Doll BA, Futrell FW, Schmitz JP, Hollinger JO. Demineralized bone matrix in bone repair: History and use. *Adv Drug Deliv Rev* 2012;64: 1063-1077.
2. Tilkeridis K, Touzopoulos P, Ververidis A, Christodoulou S, Kazakos K, Drosos GI. Use of demineralized bone matrix in spinal fusion. *World J Orthod* 2014;5:30-37.
3. Bianchini MA, Buttendorf AR, Benfatti CA, Bez LV, Ferreira CF, de Andrade RF. The use of freeze-dried bone allograft as an alternative to autogenous bone graft in the atrophic maxilla: A 3-year clinical follow-up. *Int J Periodontics Restorative Dent* 2009;29:643-647.

4. Urist MR. Bone: Formation by autoinduction. *Science* 1965;150:893-899.
5. Reddi AH. Bone morphogenetic proteins: From basic science to clinical applications. *J Bone Joint Surg Am* 2001;83-A(Pt. 1, Suppl. 1):S1-S6.
6. Zelzer E, Olsen BR. The genetic basis for skeletal diseases. *Nature* 2003;423:343-348.
7. Springer IN, Terheyden H, Geiss S, Haerle F, Hedderich J, Acxil Y. Particulated bone grafts — Effectiveness of bone cell supply. *Clin Oral Implants Res* 2004;15:205-212.
8. Bonewald LF. The amazing osteocyte. *J Bone Miner Res* 2011;26:229-238.
9. Manolagas SC, Parfitt AM. For whom the bell tolls: Distress signals from long-lived osteocytes and the pathogenesis of metabolic bone diseases. *Bone* 2013; 54:272-278.
10. Brolese E, Buser D, Kuchler U, Schaller B, Gruber R. Human bone chips release of sclerostin and FGF-23 into the culture medium: An in vitro pilot study. *Clin Oral Implants Res* 2015;26: 1211-14.
11. Caballé-Serrano J, Bosshardt DD, Buser D, Gruber R. Proteomic analysis of porcine bone-conditioned medium. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2014;29: 1208-15d.
12. Peng J, Nemec M, Brolese E, et al. Bone-conditioned medium inhibits osteogenic and adipogenic differentiation of mesenchymal cells in vitro. *Clin Implant Dent Relat Res* 2015;17:938-49.
13. Zimmermann M, Caballé-Serrano J, Bosshardt DD, Ankersmit JH, Buser D, Gruber R. Bone-conditioned medium changes gene expression in bone-derived fibroblasts. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2015;30: 953-58.
14. Becerra J, Andrades JA, Ertl DC, Sorgente N, Nimni ME. Demineralized bone matrix mediates differentiation of bone marrow stromal cells in vitro: Effect of age of cell donor. *J Bone Miner Res* 1996;11: 1703-1714.
15. Murphy BM, Suzuki RK, Sand TT, Chaput CD, Gregory CA. Short term culture of human mesenchymal stem cells with commercial osteoconductive carriers provides unique insights into biocompatibility. *J Clin Med* 2013;2:49-66.
16. Adkisson HD, Strauss-Schoenberger J, Gillis M, Wilkins R, Jackson M, Hruska KA. Rapid quantitative bioassay of osteoinduction. *J Orthop Res* 2000;18: 503-511.
17. Bligh EG, Dyer WJ. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Biochem Physiol* 1959;37:911-917.

18. Gruber R, Varga F, Fischer MB, Watzek G. Platelets stimulate proliferation of bone cells: Involvement of platelet-derived growth factor, microparticles and membranes. *Clin Oral Implants Res* 2002;13: 529-535.
19. Holt DJ, Grainger DW. Demineralized bone matrix as a vehicle for delivering endogenous and exogenous therapeutics in bone repair. *Adv Drug Deliv Rev* 2012;64:1123-1128.
20. Kao RT, Nares S, Reynolds MA. Periodontal regeneration — Intrabony defects: A systematic review from the AAP Regeneration Workshop. *J Periodontol* 2015;86(Suppl. 2):S77-S104.
21. Eskow AJ, Mealey BL. Evaluation of healing following tooth extraction with ridge preservation using cortical versus cancellous freeze-dried bone allograft. *J Periodontol* 2014;85:514-524.
22. Sawada K, Caballé-Serrano J, Schuldt Filho G, et al. Thermal processing of bone: In vitro response of mesenchymal cells to bone-conditioned medium. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2014;44:1060-66.
23. Elias JA, Zheng T, Whiting NL, et al. IL-1 and transforming growth factor-beta regulation of fibroblast derived IL-11. *J Immunol* 1994;152:2421-2429.
24. Cucoranu I, Clempus R, Dikalova A, et al. NAD(P)H oxidase 4 mediates transforming growth factor-beta1- induced differentiation of cardiac fibroblasts into myofibroblasts. *Circ Res* 2005;97:900-907.
25. Luchetti MM, Sambo P, Majlingová P, et al. Scleroderma fibroblasts constitutively express the long pentraxin PTX3. *Clin Exp Rheumatol* 2004;22(3, Suppl. 33):S66-S72.
26. Kane S, Prentice MA, Mariano JM, Cuttitta F, Jakowlew SB. Differential induction of early response genes by adrenomedullin and transforming growth factor-beta1 in human lung cancer cells. *Anticancer Res* 2002;22:1433-1444.
27. Lai KN, Leung JC, Yeung VT, Lewis LK, Nicholls MG. Gene transcription and synthesis of adrenomedullin by cultured human renal cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1998;244:567-572.
28. Vogt J, Traynor R, Sapkota GP. The specificities of small molecule inhibitors of the TGF β and BMP pathways. *Cell Signal* 2011;23:1831-1842.
29. Gao J, Symons AL, Bartold PM. Expression of transforming growth factor-beta 1 (TGF-beta1) in the developing periodontium of rats. *J Dent Res* 1998;77:1708-1716.
30. Crane JL, Cao X. Bone marrow mesenchymal stem cells and TGF-b signaling in bone remodeling. *J Clin Invest* 2014;124:466-472.

2.2 MANUSCRIPT

The following manuscript has been formatted according to the guidelines from the *Journal of Periodontology*. Impact factor: **2.706**. Qualis: **A1**.

Conditioned medium of demineralized freeze-dried bone activates gene expression in periodontal fibroblasts in vitro.

Guenther Schuldt Filho^{*†‡}, Jordi Caballé-Serrano^{*†§}, Kosaku Sawada^{*i}, Dieter D. Bosshardt^{*¶}, Marco Aurélio Bianchini^{*‡}, Daniel Buser[†] and Reinhard Gruber^{*†#}

Corresponding author: Reinhard Gruber, PhD; Laboratory of Oral Cell Biology, School of Dental Medicine, University of Bern, Freiburgstrasse 7, 3010 Bern, Switzerland; Email: reinhard.gruber@zmk.unibe.ch

Sources of support: Guenther Schuldt Filho has a scholarship from Coordination for Higher Education and Personnel Training, Brasília, Brazil; Jordi Caballé-Serrano has a scholarship from the Foundation of Dental Research and Education.

Key words: bone; conditioned media; bone substitutes; bone transplantation; TGF-beta superfamily proteins; freeze drying

Running title: DBM conditioned medium activates TGF- β signaling

* Laboratory of Oral Cell Biology, School of Dental Medicine, University of Bern, Bern, Switzerland.

† Department of Oral Surgery and Stomatology, School of Dental Medicine, University of Bern.

‡ Department of Implant Dentistry, Federal University of Santa Catarina, Florianópolis, Brazil.

§ Department of Oral and Maxillofacial Surgery, College of Dentistry, Universitat Internacional de Catalunya, Barcelona, Spain.

i Department of Cranio-Maxillofacial Surgery, Inselspital, University of Bern.

¶ Robert K. Schenk Laboratory of Oral Histology, School of Dental Medicine, University of Bern.

Department of Oral Biology, Medical University of Vienna, Vienna, Austria.

ABSTRACT

Background: Demineralized bone matrix (DBM) is used for the treatment of osseous defects. Conditioned medium from native bone chips can activate transforming growth factor- β signaling in mesenchymal cells. The aim of this study is to determine whether processing of native bone into DBM affects the activity of the conditioned medium. **Methods:** Porcine cortical bone blocks were subjected to defatting, different concentrations of hydrochloric acid (HCl), and various temperatures. DBM was lyophilized, ground, and placed into culture medium. Human gingiva and periodontal fibroblasts were exposed to the respective conditioned medium obtained from DBM (DBCM). Changes in the expression of TGF- β target genes were determined. **Results:** DBCM altered the expression of TGF- β target genes (e.g., adrenomedullin, pentraxin 3, KN motif and ankyrin repeat domains 4, interleukin 11, NADPH oxidase 4, and BTB [POZ] domain containing 11) by at least five-fold. The response was observed in fibroblasts from both sources. Defatting lowered the activity of DBCM. The TGF- β receptor type I kinase inhibitor SB431542 [4-(4-(benzo[d][1,3]dioxol-5-yl)-5-(pyridin-2-yl)-1H-imidazol-2-yl)benzamide] but not the inhibitor of bone morphogenetic protein receptor dorsomorphin, blocked the effects of DBCM on gene expression. Moreover, conditioned medium obtained from commercial human DBM modulated the expression of TGF- β target genes. **Conclusion:** The findings suggest that the DBCM can activate TGF- β signaling in oral fibroblasts.

Key-words: Bone and bones. Bone substitutes. Bone transplantation. Culture media, conditioned. Freeze drying. TGF- β superfamily proteins.

INTRODUCTION

Demineralized bone matrix (DBM) is used widely as a bone void filler in craniofacial surgery, periodontics, and orthopedics.¹⁻³ DBM comprises insoluble collagen and non-collagenous proteins that exhibit the osteoconductive and osteoinductive properties of allografts. The osteoinductive properties of DBM, which include the capacity to provoke ectopic bone formation in immuno-deficient rodent models, are maintained after processing the original bone graft.⁴ Processing includes removal of both the mineral phase with sodium chloride and lipids with acetone and methanol.¹

Proteins responsive to the osteoinductive properties of DBM, known as bone morphogenetic proteins (BMPs),⁵ remain adsorbed to the extracellular matrix (ECM).⁵ These findings do not rule out that other molecules released from DBM contribute to graft consolidation, a complex process that follows the principles of intramembranous and endochondral bone formation.⁶

Demineralized bone is different from fresh bone chips. Fresh bone chips contain viable cells,⁷ mainly osteocytes. Osteocytes have been described recently as “amazing” because they essentially control bone remodeling and have key endocrine functions.^{8,9}

Fresh bone chips release sclerostin and fibroblast growth factor-23 being produced by osteocytes.¹⁰ Moreover, conditioned medium made from fresh bone chips (“bone-conditioned medium”) contains numerous proteins¹¹ and stimulates gene expression in mesenchymal cells, mainly involving transforming growth factor (TGF)- β receptor type I kinase activity.^{12,13} Among these genes are adrenomedullin (ADM), pentraxin (PTX)3, KN motif and ankyrin repeat domains (KANK)4, interleukin (IL)11, NADPH oxidase (NOX)4, and BTB (POZ) domain containing 11 (BTBD11).¹³

Additional support for this hypothesis comes from *in vitro* reports that DBM affects the osteogenic differentiation^{14,15} and proliferation¹⁶ of mesenchymal cells. Thus, it was reasonable to suggest that DBM can also release molecules that provoke changes in gene expression.

The question was raised as to whether the conditioned medium obtained from DBM (DBCM) possesses the ability described originally for fresh bone chips¹¹⁻¹³ to provoke a robust change in gene expression in mesenchymal cells. Thus, it is the aim of the present study to perform a bioassay with DBCM *in vitro*.

MATERIALS AND METHODS

Demineralization of Bone Matrix Bone was obtained from adult pigs (Figure 1) from a butcher** within 6 hours postmortem and kept frozen. Buccal mandibular cortical bone blocks were cut with a diamond saw†† into plates of 3mm thickness and 10mm length.‡‡ Bone plates were defatted with acetone and methanol (1:1) and kept frozen (-20°C). Bone plates were then subjected to the following three treatments: 1) defatting and non-defatting; 2) demineralization with hydrochloric acid at 0.5, 1, and 2M; and 3) exposure to 4°C and room temperature. The residual acid was eliminated by vigorously washing the bone plates with distilled water for 30 minutes.



Figure 1: Porcine mandible used for obtaining demineralized bone matrix.

Subsequently, the bone plates were lyophilized§§ and ground and were then termed “demineralized bone matrix.” Von Kossa staining (Figure 2) was performed to determine mineralization. In brief, bone was cut with a microtome, soaked with silver nitrate, and exposed to bright sunlight. Mineralized areas appeared black.

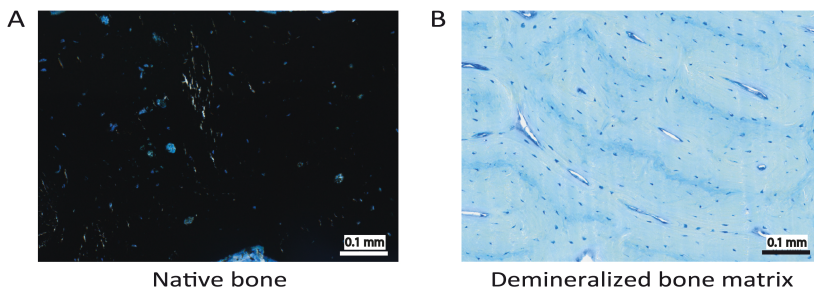


Figure 2: Von Kossa staining to determine mineralization. Mineralized areas appeared black.

Preparation of DBCM

DBM was placed in serum-free Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) (10% weight by volume) containing 100 U/mL penicillin, 100 mg/mL streptomycin, and 0.25 mg/mL amphotericin^{¶¶} and was shaken for 24 hours at room temperature. The DBCM was filtered until sterile and kept frozen (-20°C) in aliquots. Aliquots were thawed immediately before each experiment. Methanol/chloroform extraction of lipids from DBCM was prepared according to a described method.¹⁷ For the indicated experiments, commercial preparations of human DBM were used following the same protocol: 1) DBM putty,^{###} and 2) DBM powder.^{***}

Primary Mesenchymal Cells and Cell Lines Human gingival and periodontal ligament (PDL) fibroblasts were prepared from tissue grafts of two independent donors after wisdom tooth extraction. Both patients provided written informed consent for the treatment. The cantonal ethics committee of Bern approved this protocol. The ST2 mouse mesenchymal cell line was obtained from a cell bank.^{†††} All cells were cultured in a humidified atmosphere at 37°C in growth medium consisting of DMEM, 10% fetal calf serum, and antibiotics. Cells were plated in growth medium at 30.000 cells/cm² in culture dishes for 24 hours.

Cells were then exposed to 20% DBCM diluted in growth medium. For control, serum-free medium was diluted in growth medium. The cell viability test was based on live-dead staining (Figure 3).^{†††} Gene expression analysis was performed after 24 hours of cell incubation; histochemical staining of alkaline phosphatase (ALP) in ST2

cells was performed after 72 hours. For the indicated experiments, pharmacologic inhibitors were used: TGF- β receptor I kinase inhibitor (10 mM SB431542^{§§§} [4-(4-(benzo[d][1,3] dioxol-5-yl)-5-(pyridin-2-yl)-1H-imidazol-2-yl)benzamide]) and two BMP type I receptor kinase inhibitors: 10 mM dorsomorphin (inhibits activin-like kinase [ALK]-3, ALK2, BMP receptor [BMPR]-IA, and BMPR-IB [ALK6]) and 1 mM LDN193189 (4-[6-(4- piperazin-1-ylphenyl)pyrazolo[1,5-a]pyrimidin-3-yl] quinoline), which inhibits mainly ALK2 and ALK3 but also ALK4, ALK5, and ALK7.

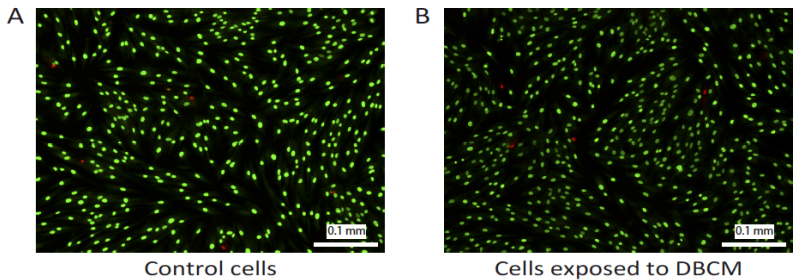


Figure 3: Live-Dead staining. Viable cells appear green and dead cells are red.

Quantitative Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction Analyses

For gene expression analysis, cellular RNA was isolated with an RNA isolation kit.ⁱⁱⁱ Reverse transcription (RT) was performed with cDNA master mix,^{iv} and polymerase chain reaction (PCR) was done with a green master mix^{###} on a real-time PCR system.^{****} Probes were indicated as follows:

human	ADM	forward,
GGACATGAAGGGTGCCTCTC		
	and	reverse,
TGTTTCATGCTCTGGCGGTAG;	human	PTX3
TGTATGTGAATTTGGACAACGAA		forward,
	and	reverse,
CATTCCGAGTGCTCCTGAC;	human	BTBD11
CAAAGCACTCCTCTCCAGCA		forward,
	and	reverse,
AATGAGCAGTGACTCTGGGC;	human	IL11
TGCACCTGACACTTGACTGG		forward,
	and	reverse,
AGTCTTCAGCAGCAGCAGTC;	human	NOX4
		forward,

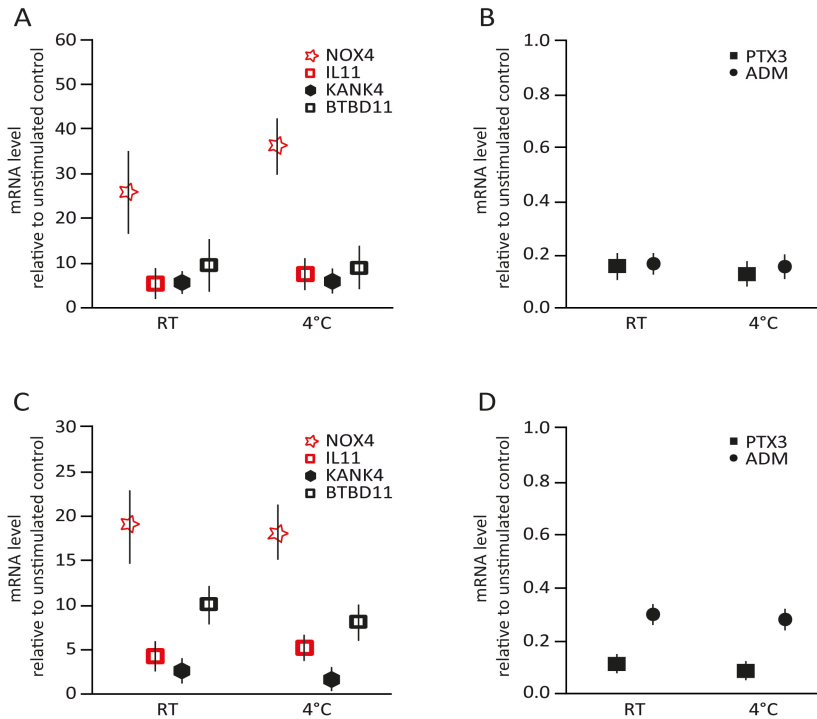


Figure 4: X-fold changes on expression of TGF- β regulated genes in gingival fibroblasts (A and B) and PDL cells (C and D) during exposure to DBCM with regard to the temperature during bone demineralization. RT = room temperature.

TCTTGGCTTACCTCCGAGGA and reverse, CTCCTGGTTCTCCTGCTTGG; human KANK4 forward, GAACCGAGGAAGTGG and reverse, CCTCTTCCTGCTGCT; and human b-actin forward, CCAACCGCGAGAAGATGA and reverse, CCAGAGGCGTACAGGGATAG. The mRNA levels were calculated by normalizing to the housekeeping gene b-actin using the comparative cycle threshold method.

ALP

For histochemical staining of ALP, ST2 mouse cells were fixed as indicated and incubated with a substrate solution containing naphthol

AS-TR phosphate and fast blue BB salt.^{††††} After rinsing with distilled water, cultures were photographed^{††††} as reported previously.¹⁸

Statistical Analyses

Experiments were repeated at least twice in duplicates or triplicates, and data were reported as mean /SD. A paired t test was used for experiments with temperature (defatting versus non-defatting and 4°C versus room temperature). Analysis of variance was used to compare the three concentrations of HCl. Statistical significance was established at $P < 0.05$.

RESULTS

Demineralization Was Successful and Oral Fibroblasts Exposed to DBCM Were Viable

To confirm demineralization, von Kossa staining was performed. Demineralization with 1M HCl at room temperature made the cortical bone structures become visible, whereas native bone appeared dark black. To rule out any adverse effects of DBCM, a live-dead staining was performed in which viable cells appear green and dead cells are red. Gingival fibroblasts remained viable when exposed to 20% DBCM for 24 hours.

Oral Fibroblasts Respond to DBCM Prepared at Different Temperatures, HCl Concentrations, and Defatting

Next, the effect of temperature during demineralization of porcine bone was evaluated. In gingival fibroblasts (Figures 4A and 4B) and PDL fibroblasts (Figures 4C and 4D), DBCM prepared at room temperature or 4°C with 1M HCl provoked a similar increase of BTBD11, IL11, KANK4, and NOX4 gene expression and a decrease of ADM and PTX3 gene expression.

To understand the influence of demineralization on the activity of the DBCM, porcine bone was subjected to incubation with 0.5 to 2M HCl at room temperature. Figure 5 shows that DBCM prepared with any of the three concentrations equally changed gene expression in gingiva and PDL fibroblasts. However, defatting of porcine bone lowered the effect of DBCM on IL11 ($P = 0.01$) and BTBD11 ($P = 0.05$) expression

based on data pooled from gingival and PDL fibroblasts; NOX4 and KANK4 showed a similar trend (Figure 6). The lipid fraction of DBM had no significant effect on gene expression.

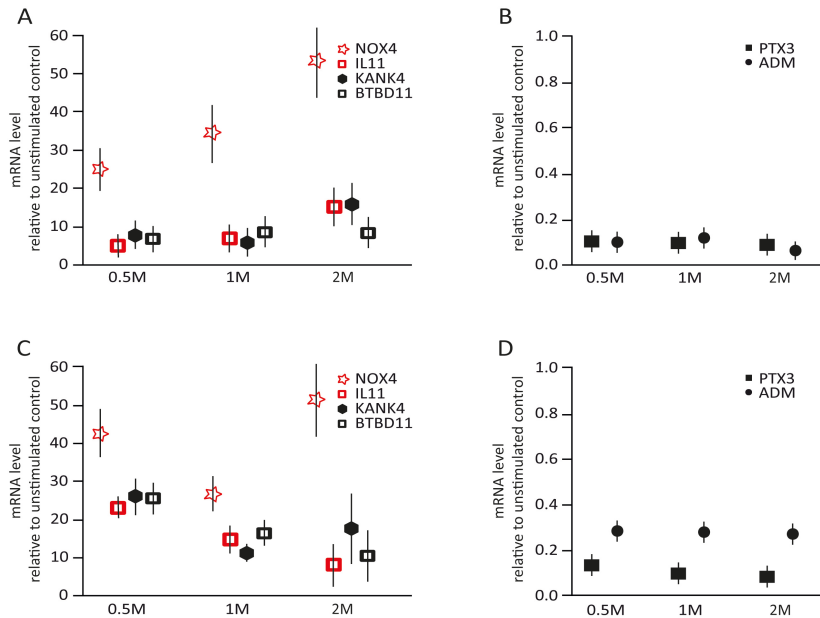


Figure 5: X-fold changes on expression of TGF- β regulated genes in gingival fibroblasts (A and B) and PDL cells (C and D) during exposure to DBCM with regard to the concentration of hydrochloric acid (0.5M to 2M) during bone demineralization (24 hours) at room temperature.

The Response of Oral Fibroblasts to DBCM Requires TGF- β Receptor I Kinase Signaling

Next, whether DBCM mediates its activity via TGF- β receptor I kinase signaling was investigated.^{12,13} SB431542 significantly blocked gene expression in gingival fibroblasts exposed to DBCM (Table 1). Pharmacologic blocking of BMPR-I kinase with dorsomorphin had no effect on the DBCM-induced changes in gene expression (Table 1). LDN193189, an inhibitor that also targets TGF- β receptor I kinase (ALK5), significantly reduced the effects of DBCM (Table 1).

Oral Fibroblasts Respond to Conditioned Medium From Commercial Human DBM

To relate the data obtained with the porcine DBM to commercial preparations obtained from human DBM, fibroblasts were exposed to a conditioned medium prepared from human DBM putty and DBM powder. Conditioned medium from DBM putty but not DBM powder moderately changed the expression of the gene panel (Table 2) in an SB431542-dependent manner. Porcine DBM was more potent than the respective conditioned medium of the human DBM putty.

DBCM Highly Suppresses ALP in ST2 Cells

To repeat previous findings obtained with freshly prepared DBCM, ST2 cells were exposed to DBCM and ALP activity was determined by histochemistry.¹² Three-day incubation of ST2 cells with DBCM as well as with the conditioned medium from DBM putty caused a robust suppression of ALP activity (Figure 7) that was confirmed by gene expression analysis.

DISCUSSION

Despite the long history and global use of bone allografts in numerous fields of regenerative medicine,^{1,19} including periodontology,^{20,21} and the pioneering work that led to the discovery of BMPs,⁴ potential paracrine mechanisms of allografts remain unclear. First attempts were made focusing on proliferation and differentiation of mesenchymal cells.¹⁴⁻¹⁶

These studies supported the idea that allografts possess a paracrine-like activity; however, there is not yet a sensitive bioassay to confirm this knowledge at the genetic level. A panel of genes was described recently that were regulated strongly when oral fibroblasts were exposed to conditioned medium from freshly prepared bone chips.¹³ Thus, it was reasonable to ask whether DBM displays similar activity.

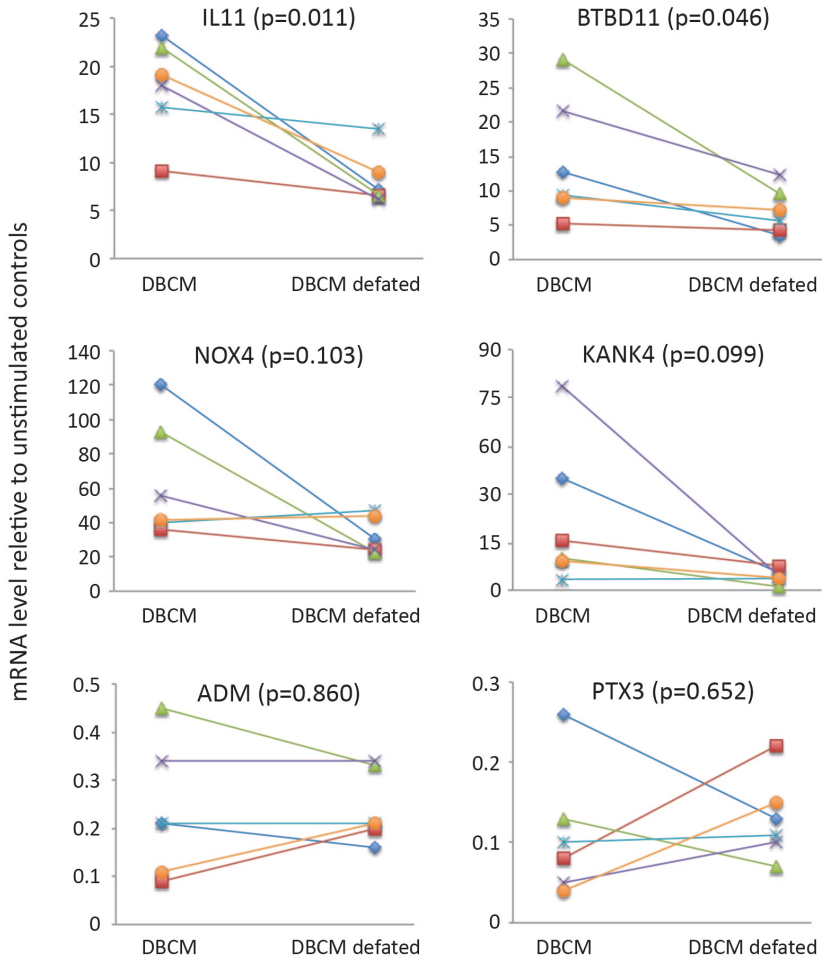


Figure 6: X-fold changes on expression of TGF- β regulated genes based on data from gingival and PDL fibroblasts. Green, purple and red lines represent three different donors of gingival fibroblast. Orange, light and dark blue lines represent PDL fibroblasts. Cells were exposed to DBCM with and without previous defatting step with acetone and methanol (1:1).

The results of the present study show that BTBD11, IL11, KANK4, and NOX4 were upregulated whereas ADM and PTX3 were downregulated when periodontal fibroblasts were exposed to DBCM. Defatting, but not processing with HCl or temperature, changed the activity of the respective DBCM, at least for the upregulated genes.

The data are in line with previous reports on native¹³ and thermally treated bone chips²² showing that changes in gene expression depend on TGF- β receptor I kinase signaling. Also the conditioned medium of a commercial human DBM putty altered gene expression via this pathway. These data suggest that freeze-dried DBM releases not yet clearly defined molecules that provoke a TGF- β receptor-dependent change in gene expression.

	ADM	PTX3	KANK4	IL11	NOX4	BTBD11
DBCM	0.28 \pm 0.09	0.15 \pm 0.10	24.27 \pm 8.17	30.32 \pm 20.08	28.92 \pm 13.87	6.16 \pm 2.41
With dorsomorphin	0.27 \pm 0.13	0.08 \pm 0.04	19.84 \pm 8.91	32.00 \pm 16.28	56.71 \pm 19.88	9.29 \pm 1.46
With LDN193189	0.47 \pm 0.21	0.40 \pm 0.21	9.97 \pm 5.80	9.91 \pm 9.97	19.14 \pm 10.56	5.23 \pm 2.33
With SB431542	0.86 \pm 0.280*	1.37 \pm 0.09*	1.11 \pm 0.36*	0.70 \pm 0.10*	1.31 \pm 0.47*	0.88 \pm 0.33*

Table 1: Effect of inhibitors of BMP and TGF- β Receptors - Dorsomorphin, the inhibitor of BMPRs, did not block the effects of DBCM on gene expression. Values shown are fold changes compared to unstimulated oral fibroblast controls. *P < 0.05 compared to DBCM based on paired t test.

	ADM	PTX3	KANK4	IL11	NOX4	BTBD11
Gingival fibroblasts						
DBM putty	0.47 \pm 0.05	1.42 \pm 0.37	4.42 \pm 4.94	4.07 \pm 2.14	4.01 \pm 1.79	4.04 \pm 2.75
DBM powder	1.01 \pm 0.20	1.48 \pm 0.27	1.38 \pm 0.16	0.79 \pm 0.01	1.23 \pm 0.08	0.90 \pm 0.25
DBCM	0.07 \pm 0.01	0.05 \pm 0.01	14.74 \pm 3.14	13.28 \pm 4.47	56.46 \pm 13.62	7.89 \pm 4.43
PDL fibroblasts						
DBM putty	0.58 \pm 0.01	1.40 \pm 0.68	2.07 \pm 0.71	2.72 \pm 1.29	2.92 \pm 0.51	3.26 \pm 0.45
DBM powder	0.97 \pm 0.19	1.41 \pm 0.43	1.60 \pm 0.12	0.62 \pm 0.18	1.60 \pm 0.40	0.86 \pm 0.01
DBCM (porcine)	0.30 \pm 0.02	0.07 \pm 0.00	25.74 \pm 12.53	15.58 \pm 5.89	65.95 \pm 22.64	18.15 \pm 5.16

Table 2: Effect of Conditioned Medium From Human DBM and Porcine DBM - Values represent the data from two independent experiments. Shown fold changes compared to unstimulated oral fibroblast controls. The data are descriptive; no statistical analysis was performed.

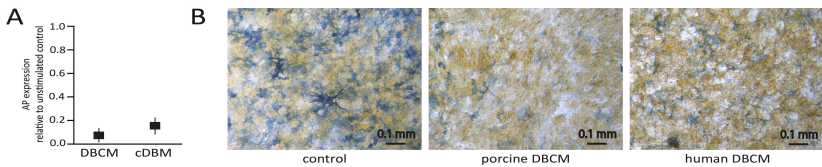


Figure 7: X-fold changes on expression of differentiation markers in ST2 cells during exposure to porcine DBCM and commercial human DBM (represented as cDBM) for 72 hours (A). Blue represents the histochemical staining of ALP (B). Original magnification x10. AP = alkaline phosphatase.

The present data confirm the paracrine-like activity of freeze-dried DBM, which provoked changes in proliferation and differentiation of mesenchymal cells.¹⁴⁻¹⁶ It has also been established that IL1²³, NOX4²⁴, and PTX3²⁵ are regulated in response to TGF- β receptor signaling. In contrast, TGF- β had no effect on ADM expression in malignant lung cells²⁶ or in mesangial cells.²⁷ It remains unclear whether the effects were caused by TGF- β within DBCM or by other molecules acting via TGF- β receptor I kinase signaling. In line with the present data, LDN193189 can inhibit ALK5 with IC₅₀ values of 0.5 μ M.²⁸ Thus, it is possible that the expression changes observed with LDN193189 involve TGF- β signaling.

Considering that dorsomorphin caused no changes in gene expression, the total data support the theory that DBCM exerts its activity via the TGF- β receptors. The clinical relevance of the present findings remains at the level of speculation. It is yet unclear whether the paracrine mechanisms contribute to the complex process of graft consolidation. Altogether, these data support the concept that the activity released from demineralized bone does not require cell viability⁹ or the resorptive activity of osteoclasts, although both aspects are critical in bone remodeling and involve TGF- β .^{29,30}

Whether the activity found in DBCM distinguishes allografts from biomaterials remains to be determined. The molecular mechanisms causing the cell response remain puzzling. The active components of DBCM are stable under acid conditions. Defatting lowered the respective activity, but the lipid fraction of DCM had no effect on gene expression.

These data suggest that the defatting process might have denatured or removed the active compound(s), which are not the lipids. Because the proteomic analysis of the conditioned medium of freshly

prepared bone chips reveals a great number of structural proteins,¹¹ it is possible that components of the ECM accumulate in the DBCM.

To our knowledge, a proteomic analysis of DBCM has not yet been performed. Another limitation is the restricted gene panel, which was chosen based on a previous study.¹³ A microarray with DBCM would show the whole genomic response of the oral fibroblasts. Thus, numerous questions such as those mentioned above remain to be answered in upcoming studies.

Future studies should focus on the response of cells other than periodontal fibroblasts, such as immune, endothelial, and epithelial cells. Moreover, upcoming studies should further reveal the effect of processing, because only one DBM released considerable activity into the conditioned medium.

It may also be worthwhile to determine the signaling mechanisms at the extracellular and intracellular levels and finally whether the in vitro findings can be translated into a clinically relevant response. The present authors envision a better understanding in the future of the mechanisms of how bone grafts contribute to bone regeneration.

The findings should help in refining the master plan for the design and development of smart biomaterials.

CONCLUSION

Conditioned medium obtained from freeze-dried DBM can provoke a considerable change in the expression of TGF- β target genes in oral fibroblasts in vitro.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank the following laboratory technicians from the University of Bern, Bern, Switzerland, for their valuable help: Catherine Solioz (Laboratory of Oral Cell Biology, School of Dental Medicine) and Monika Aeberhard, Silvia Owusu, and David Reist (Robert K. Schenk Laboratory of Oral Histology, School of Dental Medicine). The authors also thank Walter Hollenstein from Neutromedics (Cham, Switzerland) for kindly providing the human allografts for the experiments. This work was supported by a scholarship from Coordination for Higher Education and Personnel Training, Brazil (to GSF) and a scholarship from the Foundation of Dental Research and

Education, Switzerland (JC-S). The authors report no conflicts of interest related to this study.

REFERENCES

1. Gruskin E, Doll BA, Futrell FW, Schmitz JP, Hollinger JO. Demineralized bone matrix in bone repair: History and use. *Adv Drug Deliv Rev* 2012;64: 1063-1077.
2. Tilkeridis K, Touzopoulos P, Ververidis A, Christodoulou S, Kazakos K, Drosos GI. Use of demineralized bone matrix in spinal fusion. *World J Orthod* 2014;5:30-37.
3. Bianchini MA, Buttendorf AR, Benfatti CA, Bez LV, Ferreira CF, de Andrade RF. The use of freeze-dried bone allograft as an alternative to autogenous bone graft in the atrophic maxilla: A 3-year clinical follow-up. *Int J Periodontics Restorative Dent* 2009;29:643-647.
4. Urist MR. Bone: Formation by autoinduction. *Science* 1965;150:893-899.
5. Reddi AH. Bone morphogenetic proteins: From basic science to clinical applications. *J Bone Joint Surg Am* 2001;83-A(Pt. 1, Suppl. 1):S1-S6.
6. Zelzer E, Olsen BR. The genetic basis for skeletal diseases. *Nature* 2003;423:343-348.
7. Springer IN, Terheyden H, Geiss S, Hürle F, Hedderich J, Acxil Y. Particulated bone grafts — Effectiveness of bone cell supply. *Clin Oral Implants Res* 2004;15:205-212.
8. Bonewald LF. The amazing osteocyte. *J Bone Miner Res* 2011;26:229-238.
9. Manolagas SC, Parfitt AM. For whom the bell tolls: Distress signals from long-lived osteocytes and the pathogenesis of metabolic bone diseases. *Bone* 2013; 54:272-278.
10. Brolese E, Buser D, Kuchler U, Schaller B, Gruber R. Human bone chips release of sclerostin and FGF-23 into the culture medium: An in vitro pilot study. *Clin Oral Implants Res* 2015;26: 1211-14.
11. Caballé-Serrano J, Bosshardt DD, Buser D, Gruber R. Proteomic analysis of porcine bone-conditioned medium. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2014;29: 1208-15d.
12. Peng J, Nemec M, Brolese E, et al. Bone-conditioned medium inhibits osteogenic and adipogenic differentiation of mesenchymal cells in vitro. *Clin Implant Dent Relat Res* 2015;17:938-49.

13. Zimmermann M, Caballé-Serrano J, Bosshardt DD, Ankersmit JH, Buser D, Gruber R. Bone-conditioned medium changes gene expression in bone-derived fibroblasts. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2015;30: 953-58.
14. Becerra J, Andrades JA, Ertl DC, Sorgente N, Nimni ME. Demineralized bone matrix mediates differentiation of bone marrow stromal cells in vitro: Effect of age of cell donor. *J Bone Miner Res* 1996;11: 1703-1714.
15. Murphy BM, Suzuki RK, Sand TT, Chaput CD, Gregory CA. Short term culture of human mesenchymal stem cells with commercial osteoconductive carriers provides unique insights into biocompatibility. *J Clin Med* 2013;2:49-66.
16. Adkisson HD, Strauss-Schoenberger J, Gillis M, Wilkins R, Jackson M, Hruska KA. Rapid quantitative bioassay of osteoinduction. *J Orthop Res* 2000;18: 503-511.
17. Bligh EG, Dyer WJ. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Biochem Physiol* 1959;37:911-917.
18. Gruber R, Varga F, Fischer MB, Watzek G. Platelets stimulate proliferation of bone cells: Involvement of platelet-derived growth factor, microparticles and membranes. *Clin Oral Implants Res* 2002;13: 529-535.
19. Holt DJ, Grainger DW. Demineralized bone matrix as a vehicle for delivering endogenous and exogenous therapeutics in bone repair. *Adv Drug Deliv Rev* 2012;64:1123-1128.
20. Kao RT, Nares S, Reynolds MA. Periodontal regeneration — Intrabony defects: A systematic review from the AAP Regeneration Workshop. *J Periodontol* 2015;86(Suppl. 2):S77-S104.
21. Eskow AJ, Mealey BL. Evaluation of healing following tooth extraction with ridge preservation using cortical versus cancellous freeze-dried bone allograft. *J Periodontol* 2014;85:514-524.
22. Sawada K, Caballé-Serrano J, Schuldt Filho G, et al. Thermal processing of bone: In vitro response of mesenchymal cells to bone-conditioned medium. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2014;44:1060-66.
23. Elias JA, Zheng T, Whiting NL, et al. IL-1 and transforming growth factor-beta regulation of fibroblast derived IL-11. *J Immunol* 1994;152:2421-2429.
24. Cucoranu I, Clempus R, Dikalova A, et al. NAD(P)H oxidase 4 mediates transforming growth factor-beta1- induced differentiation of cardiac fibroblasts into myofibroblasts. *Circ Res* 2005;97:900-907.

25. Luchetti MM, Sambo P, Majlingová P, et al. Scleroderma fibroblasts constitutively express the long pentraxin PTX3. *Clin Exp Rheumatol* 2004;22(3, Suppl. 33):S66-S72.
26. Kane S, Prentice MA, Mariano JM, Cuttitta F, Jakowlew SB. Differential induction of early response genes by adrenomedullin and transforming growth factor-beta1 in human lung cancer cells. *Anticancer Res* 2002;22:1433-1444.
27. Lai KN, Leung JC, Yeung VT, Lewis LK, Nicholls MG. Gene transcription and synthesis of adrenomedullin by cultured human renal cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1998;244:567-572.
28. Vogt J, Traynor R, Sapkota GP. The specificities of small molecule inhibitors of the TGF β and BMP pathways. *Cell Signal* 2011;23:1831-1842.
29. Gao J, Symons AL, Bartold PM. Expression of transforming growth factor-beta 1 (TGF-beta1) in the developing periodontium of rats. *J Dent Res* 1998;77:1708-1716.
30. Crane JL, Cao X. Bone marrow mesenchymal stem cells and TGF-b signaling in bone remodeling. *J Clin Invest* 2014;124:466-472.

2.3 ARTIGO ACEITO PARA PUBLICAÇÃO

O artigo a seguir foi aceito para publicação na revista científica ***Journal of Periodontology***. Fator de impacto: **2.712**. Qualis: **A1**.

Conditioned Medium of Demineralized Freeze-Dried Bone Activates Gene Expression in Periodontal Fibroblasts In Vitro

Guenther Schuldt Filho,*†† Jordi Caballé-Serrano,*†§ Kosaku Sawada,*|| Dieter D. Bosshardt,†¶ Marco Aurélio Bianchini,† Daniel Buser,† and Reinhard Gruber*†#

Background: Demineralized bone matrix (DBM) is used for the treatment of osseous defects. Conditioned medium from native bone chips can activate transforming growth factor (TGF)- β signaling in mesenchymal cells. The aim of this study is to determine whether processing of native bone into DBM affects the activity of the conditioned medium.

Methods: Porcine cortical bone blocks were subjected to defatting, different concentrations of hydrochloric acid, and various temperatures. DBM was lyophilized, ground, and placed into culture medium. Human gingiva and periodontal fibroblasts were exposed to the respective conditioned medium obtained from DBM (DBCM). Changes in the expression of TGF- β target genes were determined.

Results: DBCM altered the expression of TGF- β target genes (e.g., *adrenomedullin*, *pentraxin 3*, *KN motif and ankyrin repeat domains 4*, *interleukin 11*, *NADPH oxidase 4*, and *BTB [POZ] domain containing 11*) by at least five-fold. The response was observed in fibroblasts from both sources. Defatting lowered the activity of DBCM. The TGF- β receptor type I kinase inhibitor SB431542 [4-(4-(benzo[d][1,3]dioxol-5-yl)-5-(pyridin-2-yl)-1H-imidazol-2-yl)benzamide] but not the inhibitor of bone morphogenetic protein receptor dorsomorphin, blocked the effects of DBCM on gene expression. Moreover, conditioned medium obtained from commercial human DBM modulated the expression of TGF- β target genes.

Conclusion: The findings suggest that the DBCM can activate TGF- β signaling in oral fibroblasts. *J Periodontol* 2015;86:827-834.

KEY WORDS

Bone and bones; bone substitutes; bone transplantation; culture media, conditioned; freeze drying; TGF-beta superfamily proteins.

* Laboratory of Oral Cell Biology, School of Dental Medicine, University of Bern, Bern, Switzerland.

† Department of Oral Surgery and Stomatology, School of Dental Medicine, University of Bern.

‡ Department of Implant Dentistry, Federal University of Santa Catarina, Florianópolis, Brazil.

§ Department of Oral and Maxillofacial Surgery, College of Dentistry, Universitat Internacional de Catalunya, Barcelona, Spain.

|| Department of Cranio-Maxillofacial Surgery, Inselspital, University of Bern.

¶ Robert K. Schenk Laboratory of Oral Histology, School of Dental Medicine, University of Bern.

Department of Oral Biology, Medical University of Vienna, Vienna, Austria.

Demineralized bone matrix (DBM) is used widely as a bone void filler in craniofacial surgery, periodontics, and orthopedics.¹⁻³ DBM comprises insoluble collagen and non-collagenous proteins that exhibit the osteoconductive and osteoinductive properties of allografts. The osteoinductive properties of DBM, which include the capacity to provoke ectopic bone formation in immuno-deficient rodent models, are maintained after processing the original bone graft.⁴ Processing includes removal of both the mineral phase with sodium chloride and lipids with acetone and methanol.¹ Proteins responsive to the osteoinductive properties of DBM, known as bone morphogenetic proteins (BMPs),⁵ remain adsorbed to the extracellular matrix (ECM).⁵ These findings do not rule out that other molecules released from DBM contribute to graft consolidation, a complex process that follows the principles of intramembranous and endochondral bone formation.⁶

Demineralized bone is different from fresh bone chips. Fresh bone chips contain viable cells,⁷ mainly osteocytes. Osteocytes have been described recently as "amazing" because they essentially control bone remodeling and have key endocrine functions.^{8,9} Fresh bone chips release sclerostin and fibroblast growth factor-23 being produced by osteocytes.¹⁰ Moreover, conditioned medium made from fresh bone chips ("bone-conditioned medium") contains numerous proteins¹¹ and stimulates gene expression in mesenchymal cells, mainly involving transforming growth factor (TGF)- β receptor type I kinase activity.^{12,13} Among these genes are *adrenomedullin* (ADM), *pentraxin* (PTX)3, *KN motif and ankyrin repeat domains* (KANK)4, *interleukin* (IL)11, *NADPH oxidase* (NOX)4, and *BTB* (POZ) domain containing 11 (BTBD11).¹³ Additional support for this hypothesis comes from in vitro reports that DBM affects the osteogenic differentiation^{14,15} and proliferation¹⁶ of mesenchymal cells. Thus, it was reasonable to suggest that DBM can also release molecules that provoke changes in gene expression.

The question was raised as to whether the conditioned medium obtained from DBM (DBCM) possesses the ability described originally for fresh bone chips¹¹⁻¹³ to provoke a robust change in gene expression in mesenchymal cells. Thus, it is the aim of the present study to perform a bioassay with DBCM in vitro.

MATERIALS AND METHODS

Demineralization of Bone Matrix

Bone was obtained from adult pigs from a butcher** within 6 hours postmortem and kept frozen. Buccal mandibular cortical bone blocks were cut with a diamond saw^{††} into plates of 3 mm thickness and 10 mm

length.^{††} Bone plates were defatted twice with acetone and methanol (1:1) and kept frozen at -20°C. Bone plates were then subjected to the following three treatments: 1) defatting and non-defatting; 2) demineralization with hydrochloric acid at 0.5, 1, and 2 M; and 3) exposure to 4°C and room temperature. The residual acid was eliminated by vigorously washing the bone plates with distilled water for 30 minutes. Subsequently, the bone plates were lyophilized^{§§} and ground^{||} and were then termed "demineralized bone matrix." von Kossa staining was performed to determine mineralization. In brief, bone was cut with a microtome, soaked with silver nitrate, and exposed to bright sunlight. Mineralized areas appeared black.

Preparation of DBCM

DBM was placed in serum-free Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) (10% weight by volume) containing 100 U/mL penicillin, 100 μ g/mL streptomycin, and 0.25 μ g/mL amphotericin^{¶¶} and was shaken for 24 hours at room temperature. The DBCM was filtered until sterile and kept frozen in aliquots at -20°C. Aliquots were thawed immediately before each experiment. Methanol/chloroform extraction of lipids from DBCM was prepared according to the method of Bligh and Dyer.¹⁷ For the indicated experiments, commercial preparations of human DBM were used following the same protocol: 1) DBM putty;^{##} and 2) DBM powder.^{***}

Primary Mesenchymal Cells and Cell Lines

Human gingival and periodontal ligament (PDL) fibroblasts were prepared from tissue grafts of two independent donors after wisdom tooth extraction. Both patients provided written informed consent for the treatment. The cantonal ethics committee of Bern approved this protocol. The ST2 mouse mesenchymal cell line was obtained from a cell bank.^{†††} All cells were cultured in a humidified atmosphere at 37°C in growth medium consisting of DMEM, 10% fetal calf serum, and antibiotics. Cells were plated in growth medium at 30,000 cells/cm² in culture dishes for 24 hours. Cells were then exposed to 20% DBCM diluted in growth medium. For control, serum-free medium was diluted in growth medium. The cell viability test was based on live-dead staining.^{†††} Gene expression analysis was performed after 24 hours of cell incubation; histochemical staining of alkaline phosphatase (ALP) in ST2 cells was performed after

** Metzgerel Balsiger, Wattenwil, Switzerland.

†† Exakt, Nordenstedt, Germany.

†† Vaisco 50, Leco, St. Joseph, MI.

§§ RC 10.22, Jouan, Saint-Herblain, France.

|| R. Quétin Bone-Mat, R. Quétin, Leimen, Germany.

¶¶ Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Carlsbad, CA.

AlloFuse Donor 113521, AlloSource, Centennial, CO.

*** Allobone Spongiosa Neuromedics, Cham, Switzerland.

††† RIKEN Cell Bank, Tsukuba, Japan.

††† Enzo Life Sciences, Lausen, Switzerland.

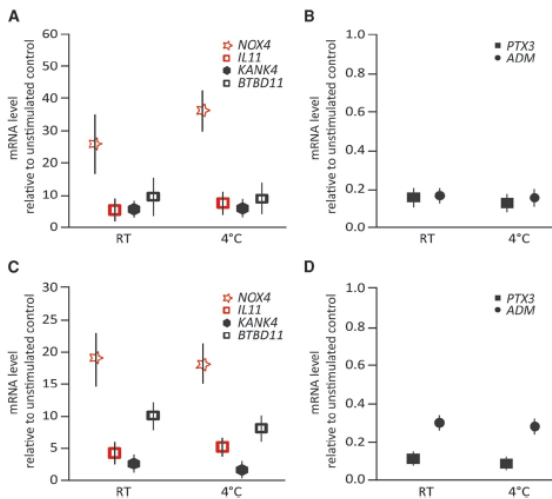


Figure 1.

X-fold changes in expression of TGF- β regulated genes in gingival fibroblasts (A and B) and PDL cells (C and D) during exposure to DBCM with regard to the temperature during bone demineralization. RT = room temperature.

72 hours. For the indicated experiments, pharmacologic inhibitors were used: TGF- β receptor I kinase inhibitor (10 μ M SB431542^{§§§} [4-(4-(benzo[d][1,3]dioxol-5-yl)-5-(pyridin-2-yl)-1H-imidazol-2-yl)benzamide]) and two BMP type I receptor kinase inhibitors: 10 mM dorsomorphin (inhibits activin-like kinase [ALK]-3, ALK2, BMP receptor [BMPR]-IA, and BMPR-IB [ALK6]) and 1 mM LDN193189 (4-[6-(4-piperazin-1-ylphenyl)pyrazolo[1,5-a]pyrimidin-3-yl]quinoline), which inhibits mainly ALK2 and ALK3 but also ALK4, ALK5, and ALK7.

Quantitative Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction Analyses

For gene expression analysis, cellular RNA was isolated with an RNA isolation kit.^{|||} Reverse transcription (RT) was performed with cDNA master mix,^{¶¶¶} and polymerase chain reaction (PCR) was done with a green master mix^{***} on a real-time PCR system.^{****} Probes were indicated as follows: human *ADM* forward, GGACATGAAGGGTGCCTCTC and reverse, TGTTCATGCTCTGGCGGTAG; human *PTX3* forward, TGTATGTGAATTTGGACAACGAA and reverse, CATTCCGAGTGCTCTGTGAC; human *BTBD11*

forward, CAAAGCACTCTCTC-CAGCA and reverse, AATGAG-CAGTGACTCTGGGC; human *IL11* forward, TGCACCTGACACTTGACTGG and reverse, AGTCTTCAGCAGCAGCAGTC; human *NOX4* forward, TCTTG-GCTTACCTCCGAGGA and reverse, CTCCTGGTCTCTGCTG-TTG; human *KANK4* forward, GAACCGAGGAAGTGG and reverse, CCTCTTCTCTGCTGCT; and human β -actin forward, CCAAC-CGCGAGAAGATGA and reverse, CCAGAGGCGTACAGGGATAG. The mRNA levels were calculated by normalizing to the housekeeping gene β -actin using the comparative cycle threshold method.

ALP

For histochemical staining of ALP, ST2 mouse cells were fixed as indicated and incubated with a substrate solution containing naphthol AS-TR phosphate and fast blue BB salt.^{††††} After rinsing with distilled water, cultures were photographed^{††††} as reported previously.¹⁸

Statistical Analyses

Experiments were repeated at least twice in duplicates or triplicates, and data were reported as mean \pm SD. A paired *t* test was used for experiments with temperature (defating versus non-defating and 4°C versus room temperature). Analysis of variance was used to compare the three concentrations of HCl. Statistical significance was established at *P* < 0.05.

RESULTS

Demineralization Was Successful and Oral Fibroblasts Exposed to DBCM Were Viable

To confirm demineralization, von Kossa staining was performed. Demineralization with 1.0 M HCl at room temperature made the cortical bone structures become visible, whereas native bone appeared dark black (see supplementary Fig. 1 in online *Journal of Periodontology*). To rule out any adverse effects of

^{§§§} Calbiochem, Merck, Billerica, MA.

^{|||} High Pure RNA Isolation Kit, Hoffmann-La Roche, Basel, Switzerland.

^{¶¶¶} Transcriptor Universal cDNA Master Mix, Hoffmann-La Roche.

^{***} FastStart Universal SYBR Green Master Mix, Hoffmann-La Roche.

^{****} 7500 Real-Time PCR System, Applied Biosystems, Life Technologies, Thermo Fisher Scientific, Carlsbad, CA.

^{††††} Sigma-Aldrich.

^{††††} DFC420 C, Leica, Wetzlar, Germany.

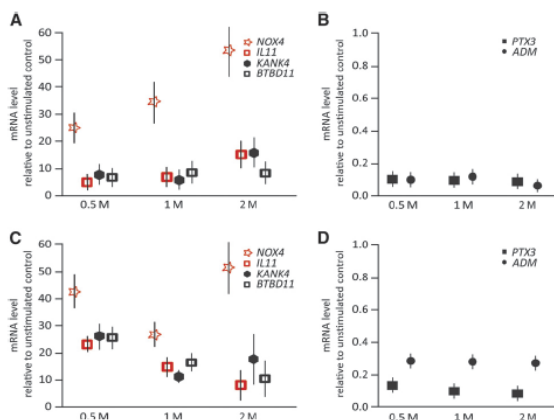


Figure 2. X-fold changes on expression of TGF- β regulated genes in gingival fibroblasts (A and B) and PDL cells (C and D) during exposure to DBCM with regard to the concentration of hydrochloric acid during bone demineralization, which was 0.5 to 2 M for 24 hours at room temperature.

DBCM, a live-dead staining was performed in which viable cells appear green and dead cells are red. Gingival fibroblasts remained viable when exposed to 20% DBCM for 24 hours (see supplementary Fig. 2 in online *Journal of Periodontology*).

Oral Fibroblasts Respond to DBCM Prepared at Different Temperatures, HCl Concentrations, and Defatting

Next, the effect of temperature during demineralization of porcine bone was evaluated. In gingival fibroblasts (Figs. 1A and 1B) and PDL fibroblasts (Figs. 1C and 1D), DBCM prepared at room temperature or 4°C with 1 M HCl provoked a similar increase of *BTBD11*, *IL11*, *KANK4*, and *NOX4* gene expression and a decrease of *ADM* and *PTX3* gene expression. To understand the influence of demineralization on the activity of the DBCM, porcine bone was subjected to incubation with 0.5 to 2 M HCl at room temperature. Figure 2 shows that DBCM prepared with any of the three concentrations equally changed gene expression in gingiva and PDL fibroblasts. However, defatting of porcine bone lowered the effect of DBCM on *IL11* ($P = 0.01$) and *BTBD11* ($P = 0.05$) expression based on data pooled from gingival and PDL fibroblasts; *NOX4* and *KANK4* showed a similar trend (Fig. 3). The lipid fraction of DBM had no significant effect on gene expression (see supplementary Table 1 in online *Journal of Periodontology*).

The Response of Oral Fibroblasts to DBCM Requires TGF- β Receptor I Kinase Signaling

Next, whether DBCM mediates its activity via TGF- β receptor I kinase signaling was investigated.^{12,13} SB431542 significantly blocked gene expression in gingival fibroblasts exposed to DBCM (Table 1). Pharmacologic blocking of BMPRI kinase with dorsomorphin had no effect on the DBCM-induced changes in gene expression (Table 1). LDN193189, an inhibitor that also targets TGF- β receptor I kinase (ALK5), significantly reduced the effects of DBCM (Table 1).

Oral Fibroblasts Respond to Conditioned Medium From Commercial Human DBM

To relate the data obtained with the porcine DBM to commercial preparations obtained from human DBM, fibroblasts were exposed to a conditioned medium prepared from human DBM putty and DBM powder. Conditioned medium from DBM putty but not DBM powder moderately changed the expression of the gene panel (Table 2) in an SB431542-dependent manner (see supplementary Table 2 in online *Journal of Periodontology*). Porcine DBM was more potent than the respective conditioned medium of the human DBM putty.

DBCM Highly Suppresses ALP in ST2 Cells

To repeat previous findings obtained with freshly prepared DBCM, ST2 cells were exposed to DBCM and ALP activity was determined by histochemistry.¹² Three-day incubation of ST2 cells with DBCM as well as with the conditioned medium from DBM putty caused a robust suppression of ALP activity (Fig. 4) that was confirmed by gene expression analysis (data not shown).

DISCUSSION

Despite the long history and global use of bone allografts in numerous fields of regenerative medicine,^{1,19} including periodontology,^{20,21} and the pioneering work that led to the discovery of BMPs,⁴ potential paracrine mechanisms of allografts remain unclear. First attempts were made focusing on proliferation and differentiation of mesenchymal cells.¹⁴⁻¹⁶ These studies supported the idea that allografts possess a paracrine-like activity; however, there is

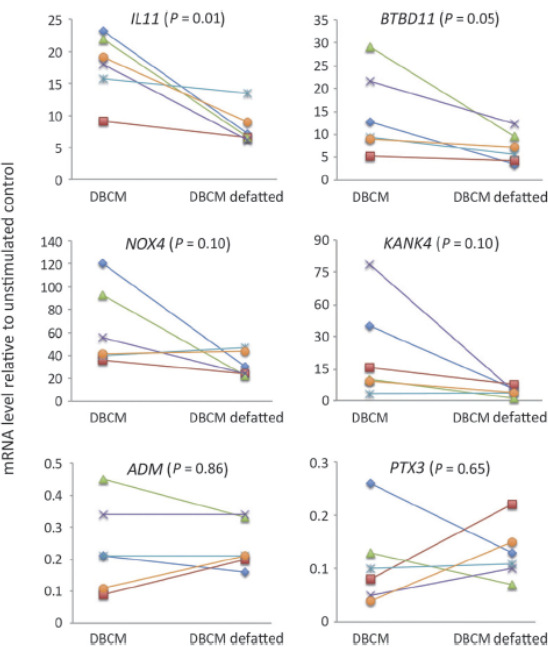


Figure 3. X-fold changes on expression of TGF- β regulated genes based on data from gingival and PDL fibroblasts. Green, purple and red lines represent three different donors of gingival fibroblast. Orange, light and dark blue lines represent PDL fibroblasts. Cells were exposed to DBCM with and without previous defatting step with acetone and methanol (1:1).

not yet a sensitive bioassay to confirm this knowledge at the genetic level. A panel of genes was described recently that were regulated strongly when oral fibroblasts were exposed to conditioned medium from freshly prepared bone chips.¹³ Thus, it was reasonable to ask whether DBM displays similar activity.

The results of the present study show that *BTBD11*, *IL11*, *KANK4*, and *NOX4* were up-regulated whereas *ADM* and *PTX3* were downregulated when periodontal fibroblasts were exposed to DBCM. Defatting, but not processing with HCl or temperature, changed the activity of the respective DBCM, at least for the upregulated genes. The data are in line with previous reports on native¹³ and thermally treated bone chips²² showing that changes in gene expression depend on TGF- β receptor I kinase signaling. Also the conditioned medium of a commercial human DBM putty altered gene expression via this pathway. These data suggest that freeze-dried DBM releases not yet clearly defined molecules that provoke a TGF- β receptor-dependent change in gene expression.

The present data confirm the paracrine-like activity of

Table 1.
Effect of Inhibitors of BMP and TGF- β Receptors

	ADM	PTX3	KANK4	IL11	NOX4	BTBD11
DBCM	0.28 \pm 0.09	0.15 \pm 0.10	24.27 \pm 8.17	30.32 \pm 20.08	28.92 \pm 13.87	6.16 \pm 2.41
With dorsomorphin	0.27 \pm 0.13	0.08 \pm 0.04	19.84 \pm 8.91	32.00 \pm 16.28	56.71 \pm 19.88	9.29 \pm 1.46
With LDN193189	0.47 \pm 0.21	0.40 \pm 0.21	9.97 \pm 5.80	9.91 \pm 9.97	19.14 \pm 10.56	5.23 \pm 2.33
With SB431542	0.86 \pm 0.280*	1.37 \pm 0.09*	1.11 \pm 0.36*	0.70 \pm 0.10*	1.31 \pm 0.47*	0.88 \pm 0.33*

Dorsomorphin, the inhibitor of BMPRs, did not block the effects of DBCM on gene expression. Values shown are fold changes compared to unstimulated oral fibroblast controls. *P < 0.05 compared to DBCM based on paired t test.

Table 2.
Effect of Conditioned Medium From Human DBM and Porcine DBM

	ADM	PTX3	KANK4	IL11	NOX4	BTBD11
Gingival fibroblasts						
DBM putty	0.47 ± 0.05	1.42 ± 0.37	4.42 ± 4.94	4.07 ± 2.14	4.01 ± 1.79	4.04 ± 2.75
DBM powder	1.01 ± 0.20	1.48 ± 0.27	1.38 ± 0.16	0.79 ± 0.01	1.23 ± 0.08	0.90 ± 0.25
DBCM	0.07 ± 0.01	0.05 ± 0.01	14.74 ± 3.14	13.28 ± 4.47	56.46 ± 13.62	7.89 ± 4.43
PDL fibroblasts						
DBM putty	0.58 ± 0.01	1.40 ± 0.68	2.07 ± 0.71	2.72 ± 1.29	2.92 ± 0.51	3.26 ± 0.45
DBM powder	0.97 ± 0.19	1.41 ± 0.43	1.60 ± 0.12	0.62 ± 0.18	1.60 ± 0.40	0.86 ± 0.01
DBCM (porcine)	0.30 ± 0.02	0.07 ± 0.00	25.74 ± 12.53	15.58 ± 5.89	65.95 ± 22.64	18.15 ± 5.16

Values represent the data from two independent experiments. Shown fold changes compared to unstimulated oral fibroblast controls. The data are descriptive; no statistical analysis was performed.

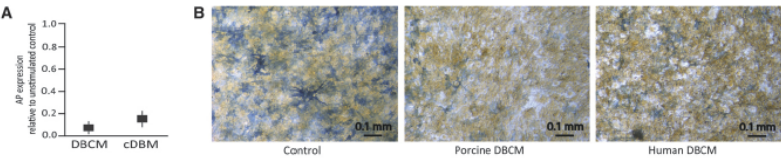


Figure 4.
X-fold changes on expression of differentiation markers in ST2 cells during exposure to porcine DBCM and commercial human DBM (represented as dDBM) for 72 hours (A). Blue represents the histochemical staining of ALP (B). Original magnification $\times 10$. AP = alkaline phosphatase.

freeze-dried DBM, which provoked changes in proliferation and differentiation of mesenchymal cells.^{14–16} It has also been established that *IL11*,²³ *NOX4*,²⁴ and *PTX3*²⁵ are regulated in response to TGF-β receptor signaling. In contrast, TGF-β had no effect on *ADM* expression in malignant lung cells²⁶ or in mesangial cells.²⁷ It remains unclear whether the effects were caused by TGF-β within DBCM or by other molecules acting via TGF-β receptor I kinase signaling. In line with the present data, LDN193189 can inhibit ALK5 with IC₅₀ values of 0.5 μM.²⁸ Thus, it is possible that the expression changes observed with LDN193189 involve TGF-β signaling. Considering that dorsomorphin caused no changes in gene expression, the total data support the theory that DBCM exerts its activity via the TGF-β receptors.

The clinical relevance of the present findings remains at the level of speculation. It is yet unclear whether the paracrine mechanisms contribute to the complex process of graft consolidation. Altogether, these data support the concept that the activity released from demineralized bone does not require cell viability⁹ or the resorptive activity of osteoclasts, although both aspects are critical in bone remodeling and involve TGF-β.^{29,30} Whether the activity found in

DBCM distinguishes allografts from biomaterials remains to be determined.

The molecular mechanisms causing the cell response remain puzzling. The active components of DBCM are stable under acid conditions. Defatting lowered the respective activity, but the lipid fraction of DCM had no effect on gene expression. These data suggest that the defatting process might have denatured or removed the active compound(s), which are not the lipids. Because the proteomic analysis of the conditioned medium of freshly prepared bone chips reveals a great number of structural proteins,¹¹ it is possible that components of the ECM accumulate in the DBCM. To our knowledge, a proteomic analysis of DBCM has not yet been performed. Another limitation is the restricted gene panel, which was chosen based on a previous study.¹³ A microarray with DBCM would show the whole genomic response of the oral fibroblasts. Thus, numerous questions such as those mentioned above remain to be answered in upcoming studies.

Future studies should focus on the response of cells other than periodontal fibroblasts, such as immune, endothelial, and epithelial cells. Upcoming studies should further reveal the effect of processing, because only one DBM released considerable activity

into the conditioned medium. It may also be worthwhile to determine the signaling mechanisms at the extracellular and intracellular levels and finally whether the in vitro findings can be translated into a clinically relevant response. The present authors envision a better understanding in the future of the mechanisms of how bone grafts contribute to bone regeneration. The findings should help in refining the master plan for the design and development of smart biomaterials.

CONCLUSION

Conditioned medium obtained from freeze-dried DBM can provoke a considerable change in the expression of TGF- β target genes in oral fibroblasts in vitro.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank the following laboratory technicians from the University of Bern, Bern, Switzerland, for their valuable help: Catherine Soloz (Laboratory of Oral Cell Biology, School of Dental Medicine) and Monika Aeberhard, Silvia Owusu, and David Reist (Robert K. Schenk Laboratory of Oral Histology, School of Dental Medicine). The authors also thank Walter Hollenstein from Neutromedics (Cham, Switzerland) for kindly providing the human allografts for the experiments. This work was supported by a scholarship from Coordination for Higher Education and Personnel Training, Brazil (to GSF) and a scholarship from the Foundation of Dental Research and Education, Switzerland (JC-S). The authors report no conflicts of interest related to this study.

REFERENCES

- Gruskin E, Doll BA, Futrell FW, Schmitz JP, Hollinger JO. Demineralized bone matrix in bone repair: History and use. *Adv Drug Deliv Rev* 2012;64:1063-1077.
- Tilkeridis K, Touzopoulos P, Ververidis A, Christodoulou S, Kazakos K, Drosos GI. Use of demineralized bone matrix in spinal fusion. *World J Orthod* 2014;5:30-37.
- Bianchini MA, Buttendorf AR, Benfatti CA, Bez LV, Ferreira CF, de Andrade RF. The use of freeze-dried bone allograft as an alternative to autogenous bone graft in the atrophic maxilla: A 3-year clinical follow-up. *Int J Periodontics Restorative Dent* 2009;29:643-647.
- Urist MR. Bone: Formation by autoinduction. *Science* 1965;150:893-899.
- Reddi AH. Bone morphogenetic proteins: From basic science to clinical applications. *J Bone Joint Surg Am* 2001;83-A(Pt. 1, Suppl. 1):S1-S6.
- Zelzer E, Olsen BR. The genetic basis for skeletal diseases. *Nature* 2003;423:343-348.
- Springer IN, Terheyden H, Geiss S, Härle F, Hedderich J, Agl Y. Particulated bone grafts — Effectiveness of bone cell supply. *Clin Oral Implants Res* 2004;15:205-212.
- Bonewald LF. The amazing osteocyte. *J Bone Miner Res* 2011;26:229-238.
- Manolagas SC, Parfitt AM. For whom the bell tolls: Distress signals from long-lived osteocytes and the pathogenesis of metabolic bone diseases. *Bone* 2013;54:272-278.
- Brolese E, Buser D, Kuchler U, Schaller B, Gruber R. Human bone chips release of sclerostin and FGF-23 into the culture medium: An in vitro pilot study [published online ahead of print June 2, 2014]. *Clin Oral Implants Res*. doi:10.1111/clr.12432.
- Caballé-Serrano J, Bosshardt DD, Buser D, Gruber R. Proteomic analysis of porcine bone-conditioned medium. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2014;29:1208-125d.
- Peng J, Nemecek M, Brolese E, et al. Bone-conditioned medium inhibits osteogenic and adipogenic differentiation of mesenchymal cells in vitro (published online ahead of print January 27, 2014). *Clin Implant Dent Relat Res*. doi:10.1111/cid.12200.
- Zimmermann M, Caballé-Serrano J, Bosshardt DD, Ankersmit JH, Buser D, Gruber R. Bone-conditioned medium changes gene expression in bone-derived fibroblasts. *Int J Oral Maxillofac Implants*.
- Becerra J, Andradas JA, Ertl DC, Sorgente N, Nimmi ME. Demineralized bone matrix mediates differentiation of bone marrow stromal cells in vitro: Effect of age of cell donor. *J Bone Miner Res* 1996;11:1703-1714.
- Murphy BM, Suzuki RK, Sand TT, Chaput CD, Gregory CA. Short term culture of human mesenchymal stem cells with commercial osteoconductive carriers provides unique insights into biocompatibility. *J Clin Med* 2013;2:49-66.
- Adkisson HD, Strauss-Schoenberger J, Gillis M, Wilkins R, Jackson M, Hruska KA. Rapid quantitative bioassay of osteoinduction. *J Orthop Res* 2000;18:503-511.
- Bligh EG, Dyer WJ. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Biochem Physiol* 1959;37:911-917.
- Gruber R, Varga F, Fischer MB, Watzek G. Platelets stimulate proliferation of bone cells: Involvement of platelet-derived growth factor, microparticles and membranes. *Clin Oral Implants Res* 2002;13:529-535.
- Holt DJ, Grainger DW. Demineralized bone matrix as a vehicle for delivering endogenous and exogenous therapeutics in bone repair. *Adv Drug Deliv Rev* 2012;64:1123-1128.
- Kao RT, Nares S, Reynolds MA. Periodontal regeneration — Intrabony defects: A systematic review from the AAP Regeneration Workshop. *J Periodontol* 2015;86(Suppl. 2):S77-S104.
- Eskow AJ, Mealey BL. Evaluation of healing following tooth extraction with ridge preservation using cortical versus cancellous freeze-dried bone allograft. *J Periodontol* 2014;85:514-524.
- Sawada K, Caballé-Serrano J, Schultdt Filho G, et al. Thermal processing of bone: In vitro response of mesenchymal cells to bone-conditioned medium [published online ahead of print April 10, 2015]. *Int J Oral Maxillofac Surg*. doi:10.1016/j.ijom.2015.03.012.
- Elias JA, Zheng T, Whiting NL, et al. IL-1 and transforming growth factor- β regulation of fibroblast-derived IL-11. *J Immunol* 1994;152:2421-2429.

24. Cucoranu I, Clempus R, Dikalova A, et al. NAD(P)H oxidase 4 mediates transforming growth factor-beta1-induced differentiation of cardiac fibroblasts into myofibroblasts. *Circ Res* 2005;97:900-907.
25. Luchetti MM, Sambo P, Majlingová P, et al. Scleroderma fibroblasts constitutively express the long pentraxin PTX3. *Clin Exp Rheumatol* 2004;22(3, Suppl. 33):S66-S72.
26. Kane S, Prentice MA, Mariano JM, Cuttitta F, Jakowlew SB. Differential induction of early response genes by adrenomedullin and transforming growth factor-beta1 in human lung cancer cells. *Anticancer Res* 2002;22:1433-1444.
27. Lai KN, Leung JC, Yeung VT, Lewis LK, Nicholls MG. Gene transcription and synthesis of adrenomedullin by cultured human renal cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1998;244:567-572.
28. Vogt J, Traynor R, Sapkota GP. The specificities of small molecule inhibitors of the TGF β and BMP pathways. *Cell Signal* 2011;23:1831-1842.
29. Gao J, Symons AL, Bartold PM. Expression of transforming growth factor-beta 1 (TGF-beta1) in the developing periodontium of rats. *J Dent Res* 1998;77:1708-1716.
30. Crane JL, Cao X. Bone marrow mesenchymal stem cells and TGF- β signaling in bone remodeling. *J Clin Invest* 2014;124:466-472.

Correspondence: Dr. Reinhard Gruber, Laboratory of Oral Cell Biology, School of Dental Medicine, University of Bern, Freiburgstrasse 7, 3010 Bern, Switzerland. E-mail: reinhard.gruber@zmk.unibe.ch.

Submitted November 25, 2014; accepted for publication February 2, 2015.

Capítulo III

3.1 BIBLIOGRAFIA CONSULTADA

ADKISSON, H. D.; STRAUSS-SCHOENBERGER, J.; GILLIS, M.; WILKINS, R.; JACKSON, M.; HRUSKA, K. A. Rapid quantitative bioassay of osteoinduction. **J Orthop Res.**, v. 18, p. 503-511, 2000.

BECERRA, J.; ANDRADES, J.A.; ERTI, D.C.; SORGENTE, N.; NIMNI, M.E. Demineralized bone matrix mediates differentiation of bone marrow stromal cells in vitro: Effect of age of cell donor. **J Bone Miner Res.**, v. 11, p. 1703-1714, 1996.

BIANCHINI, M. A.; BUTTENDORF, A. R.; BENFATTI, C. A.; BEZ, L. V.; FERREIRA, C. F.; DE ANDRADE, R. F. The use of freeze-dried bone allograft as an alternative to autogenous bone graft in the atrophic maxilla: A 3-year clinical follow-up. **Int J Periodontics Restorative Dent.**, v. 29, p. 643-647, 2009.

BLIGH, E. G.; DYER, W. J. A rapid method of total lipid extraction and purification. **Can J Biochem Physiol.**, v. 37, p. 911-917, 1959.

BONEWALD, L. F. The amazing osteocyte. **J Bone Miner Res.**, v. 26, p. 229-238, 2011.

BROLESE, E.; BUSER, D.; KUCHLER, U.; SCHALLER, B.; GRUBER, R. Human bone chips release of sclerostin and FGF-23 into the culture medium: An in vitro pilot study. **Clin Oral Implants Res.**, v. 26, p. 1211-1214, 2015.

CABALLÉ-SERRANO, J.; BOSSHARDT, D. D.; BUSER, D.; GRUBER, R. Proteomic analysis of porcine bone-conditioned medium. **Int J Oral Maxillofac Implants.**, v. 29, p. 1208-1215, 2014.

CRANE J. L.; CAO, X. Bone marrow mesenchymal stem cells and TGF- β signaling in bone remodeling. **J Clin Invest.**, v. 124, p. 466-472, 2014.

CUCORANU, I.; CLEMPUS, R.; DIKALOVA, A.; PHELAN, P. J.; ARIYAN, S.; DIKALOV, S.; SORESCU, D. NAD(P)H oxidase 4 mediates transforming growth factor- β 1- induced differentiation of cardiac fibroblasts into myofibroblasts. **Circ Res.**, v. 97, p. 900-907, 2005.

ELIAS, J. A.; ZHENG, T.; WHITING, N. L.; TROW, T. K.; MERRILL, W. W.; ZITNIK, R.; RAY, P.; ALDERMAN, E. M. IL-1 and transforming growth factor-beta regulation of fibroblast derived IL-11. **J Immunol.**, v. 152, p. 2421-2429, 1994.

ESKOW, A. J.; MEALEY, B. L. Evaluation of healing following tooth extraction with ridge preservation using cortical versus cancellous freeze-dried bone allograft. **J Periodontol.**, v. 85, p. 514-524, 2014.

GAO, J.; SYMONS, A. L.; BARTOLD, P. M. Expression of transforming growth factor-beta 1 (TGF-beta1) in the developing periodontium of rats. **J Dent Res.**, v. 77, p. 1708-1716, 1998.

GRUBER, R.; VARGA, F.; FISCHER, M. B.; WATZEK, G. Platelets stimulate proliferation of bone cells: Involvement of platelet-derived growth factor, microparticles and membranes. **Clin Oral Implants Res.**, v. 13, p. 529-535, 2002.

GRUSKIN, E.; DOLL, B. A.; FUTRELL, F. W.; SCHMITZ, J. P.; HOLLINGER, J. O. Demineralized bone matrix in bone repair: History and use. **Adv Drug Deliv Rev.**, v. 64, p. 1063-1077, 2012.

HOLT, D. J.; GRAINGER, D. W. Demineralized bone matrix as a vehicle for delivering endogenous and exogenous therapeutics in bone repair. **Adv Drug Deliv Rev.**, v. 64, p. 1123-1128, 2012.

HONSAWEK, S.; POWERS, R. M.; WOLFINBARGER, L. Extractable bone morphogenetic protein and correlation with induced new bone formation in an in vivo assay in the athymic mouse model. **Cell Tissue Bank.**, v. 6, p. 13-23, 2005.

KANE, S.; PRENTICE, M. A.; MARIANO, J. M.; CUTTITTA, F.; JAKOWLEW, S.B. Differential induction of early response genes by adrenomedullin and transforming growth factor-beta1 in human lung cancer cells. **Anticancer Res.**, v. 22, p. 1433-1444, 2002.

KAO, R. T.; NARES, S.; REYNOLDS, M. A. Periodontal regeneration - Intrabony defects: A systematic review from the AAP Regeneration Workshop. **J Periodontol.**, v. 86(Suppl. 2), p. 77-104, 2015.

LAI, K. N.; LEUNG, J. C.; YEUNG, V. T.; LEWIS, L. K.; NICHOLLS, M. G. Gene transcription and synthesis of adrenomedullin by cultured human renal cells. **Biochem Biophys Res Commun.**, v. 244, p. 567-572, 1998.

LUCHETTI, M. M.; SAMBO, P.; MAJLINGOVÁ, P.; SVEGLIATI BARONI, S.; PERI, G.; PARONCINI, P.; INTRONA, M.; STOPPACCIARO, A.; MANTOVANI, A.; GABRIELLI, A. Scleroderma fibroblasts constitutively express the long pentraxin PTX3. **Clin Exp Rheumatol.**, v. 22, p. 66-72, 2004.

MANOLAGAS, S. C.; PARFITT, A. M. For whom the bell tolls: Distress signals from long-lived osteocytes and the pathogenesis of metabolic bone diseases. **Bone.**, v. 54, p. 272-278, 2013.

MURPHY, M. B.; SUZUKI, R. K.; SAND, T. T.; CHAPUT, C. D.; GREGORY, C. A. Short term culture of human mesenchymal stem cells with commercial osteoconductive carriers provides unique insights into biocompatibility. **J Clin Med.**, v. 2, p. 49-66, 2013.

PENG, J.; NEMEC, M.; BROLESE, E.; BOSSHARDT, D. D.; SCHALLER, B.; BUSER, D.; GRUBER, R. Bone-conditioned medium inhibits osteogenic and adipogenic differentiation of mesenchymal cells in vitro. **Clin Implant Dent Relat Res.**, v. 17, p. 938-949, 2015.

REDDI, A. H. Bone morphogenetic proteins: From basic science to clinical applications. **J Bone Joint Surg Am.**, v. 83, p. S1-S6, 2001.

SAWADA, K.; CABALLÉ-SERRANO, J.; SCHULDT FILHO, G.; BOSSHARDT, D. D.; SCHALLER, B.; BUSER, D.; GRUBER, R. Thermal processing of bone: In vitro response of mesenchymal cells to bone-conditioned medium. **Int J Oral Maxillofac Surg.**, v. 44, p. 1060-1066, 2015.

SPRINGER, I. N.; TERHEYDEN, H.; GEISS, S.; HÄRLE, F.; HEDDERICH, J.; AÇIL, Y. Particulated bone grafts - Effectiveness of bone cell supply. **Clin Oral Implants Res.**, v. 15, p. 205-212, 2004.

TILKERIDIS, K.; TOUZOPOULOS, P.; VERVERIDIS, A.; CHRISTODOULOU, S.; KAZAKOS, K.; DROSOS, G.I. Use of

demineralized bone matrix in spinal fusion. **World J Orthod.**, v. 5, p. 30-37, 2014.

URIST, M. R. Bone: Formation by autoinduction. **Science.**, v. 150, p. 893-899, 1965

URIST, M. R.; NOGAMI, N. Morphogenetic substratum for differentiation of cartilage in tissue culture. **Nature.**, v. 225, p. 1051-1052, 1970.

URIST, M. R.; STRATES, B.S. Bone morphogenetic protein. **J. Dent Res.**, v. 50, p. 1392–1406, 1971.

VOGT, J.; TRAYNOR, R.; SAPKOTA, G. P. The specificities of small molecule inhibitors of the TGF β and BMP pathways. **Cell Signal.**, v. 23, p. 1831-1842, 2011.

ZELZER, E.; OLSEN B. R. The genetic basis for skeletal diseases. **Nature.**, v. 423, p. 343-348, 2003.

ZIMMERMANN, M.; CABALLÉ-SERRANO, J.; BOSSHARDT, D. D.; ANKERSMIT, H. J.; BUSER, D.; GRUBER, R. Bone-conditioned medium changes gene expression in bone-derived fibroblasts. **Int J Oral Maxillofac Implants.**, v. 30, p. 953-958, 2015.

Capítulo IV

4.1 ARTIGOS PUBLICADOS DURANTE O DOUTORADO

CABALLÉ-SERRANO, J.; SCHULDT FILHO, G.; BOSSHARDT, D. D.; GARGALLO-ALBIOL, J.; BUSER, D.; GRUBER, R. Conditioned medium from fresh and demineralized bone enhances osteoclastogenesis in murine bone marrow cultures. **Clinical Oral Implants Res.**, v. 1, p. 1-7, 2015.

CABALLÉ-SERRANO, J.; SCHULDT FILHO, G.; SAWADA, K.; BOSSHARDT, D. D.; BUSER, D.; GRUBER, R. Bone Conditioned Medium: Preparation and Bioassay. **Journal of Visualized Experiments.**, v. 101, p. 1-6, 2015.

SAWADA, K.; CABALLÉ-SERRANO, J.; SCHULDT FILHO, G.; BOSSHARDT, D. D.; SCHALLER, B.; BUSER, D.; GRUBER, R. Thermal processing of bone: in vitro response of mesenchymal cells to bone-conditioned medium. **International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery.**, v. 44, p. 1060-1066, 2015.

SCHULDT FILHO, G.; SCHULDT, G.; JACOB, S. M. M.; RODRIGUES, M. A. P.; DALAGO, H. R.; BORTOLI JUNIOR, N.; BIANCHINI, M. A. Extensão da reabilitação protética implantossuportada e a relação com o índice de placa modificado. **ImplantNews.**, v. 12, p. 351-355, 2015.

MAGRIN, G. L.; RAFAEL, C. F.; MORSCH, C. S.; SCHULDT FILHO, G.; BENFATTI, C. A. M.; BIANCHINI, M. A. Tratamento cirúrgico de periimplantite: relato de caso com 3 anos de acompanhamento. **Full Dentistry in Science.**, v. 6, p. 479-485, 2015.

SCHULDT FILHO, G.; RODRIGUES, M. A. P.; PEREIRA, K. C. R.; BIANCHINI, M. A. Avaliação das taxas de sucesso e sobrevivência de 497 implantes há cinco ou mais anos em função - Estudo retrospectivo com 139 pacientes. **ImplantNews.**, v. 12, p. 661-664, 2015.

ALECIO, A. B. W.; SOUZA J. G. O.; SCHULDT FILHO, G.; DALAGO, H. R.; BIANCHINI, M. A. Relação entre o índice de placa modificado e a prevalência das doenças peri-implantares ao redor de implantes osseointegrados. **Full Dentistry in Science.**, v. 5, p. 264-268, 2014.

SCHULDT FILHO, G.; SOUZA, J. G. O.; TOSIN, C. A.; OURIQUES, F. D.; DALAGO, H. R.; BIANCHINI, M. A. Management of accidental aspiration of foreign bodies in implant dentistry. **International Journal of Stomatology & Occlusion Medicine.**, v. 7, p. 22-24, 2014.

RODRIGUES, M. A .P.; Dalago, H. R.; SCHULDT FILHO, G.; MARKERT, S. M.; BORTOLI JUNIOR, N.; BIANCHINI, M. A. A gengiva artificial pode influenciar na prevalência das doenças peri-implantares? **ImplantNews.**, v. 11, p. 187-190, 2014.

SCHULDT FILHO, G.; DALAGO, H. R.; SOUZA, J .G. O.; STANLEY, K.; JOVANOVIC, S.; BIANCHINI, M. A. Prevalence of peri-implantitis in patients with implant-supported fixed prostheses. **Quintessence International.**, v. 10, p. 861-868, 2014.

PASSONI, B .B.; DALAGO, H. R.; SCHULDT FILHO, G.; SOUZA J. G. O.; BENFATTI, C. A. M.; MAGINI, R. S.; BIANCHINI, M. A. Does the number of implants have any relation with peri-implant disease? **Journal of Applied Oral Science.**, v. 22, p. 403-408, 2014.

MAGRIN, G. L.; DALAGO, H. R.; SCHULDT FILHO, G.; RODRIGUES, M. A. P.; BORTOLI JUNIOR, N.; BENFATTI, C. A. M.; BIANCHINI, M. A. Avaliação transversal retrospectiva do desempenho clínico dos parafusos protéticos do sistema Implacil De Bortoli com cinco ou mais anos em função. **ImplantNews.**, v. 11, p. 514-518, 2014.

DALAGO, H. R.; SCHULDT FILHO, G.; JACOB, S. M. M.; BORTOLI JUNIOR, N.; BIANCHINI, M. A.; BENFATTI, C. A .M.; MAGINI, R .S. Tipo de reabilitação protética implantossuportada versus histórico de doença periodontal e higiene oral: estudo transversal com 916 implantes, com pelo menos um ano em função. **ImplantNews.**, v. 11, p. 475-479, 2014.

PRADO, A. M.; TEIXEIRA, K. N.; SCHULDT FILHO, G.; FREITAS, S. T.; VOLPATO, C. M.; VASCONCELLOS, D. K. Avaliação da experiência e do grau de satisfação de pacientes tratados com próteses totais fixas sobre implantes. **Dental Press Implantology.**, v. 8, p. 60-67, 2014.

MAGALHAES JUNIOR, E. B.; DALAGO, H. R.; FREITAS, C. C. R.; SCHULDT FILHO, G.; SOUZA, J. G. O.; GIL, J. N. Análise da frequência de ressonância de implantes zigomáticos submetidos à função imediata. **Full Dentistry in Science**, v. 4, p. 390-394, 2013.

CANTO, G. L.; FREITAS, S. T.; SCHULDT FILHO, G.; VIEIRA, R. S. Association between mandibular torus and parafunctional activity: A case-control study. **International Journal of Stomatology & Occlusion Medicine**, v. 6, p. 43-49, 2013.

SOUZA, J. G. O.; PEREIRA NETO, A. R. L.; SCHULDT FILHO, G.; DALAGO, H. R.; SOUZA JR, J. M.; BIANCHINI, M. A. Impact of local and systemic factors on additional peri-implant bone loss. **Quintessence International**, v. 44, p. 415-424, 2013.

PASSONI, B. B.; SCHULDT FILHO, G.; DALAGO, H. R.; SOUZA J. G. O.; BIANCHINI, M. A. Importância da mucosa ceratinizada e da localização do implante no sangramento à sondagem ao redor dos implantes osseointegrados. **Revista Dental Press de Periodontia e Implantologia**, v. 7, p. 79-83, 2013.

SOUZA, J. G. O.; CLAUS, J. D. P.; GIL, L. F.; SCHULDT FILHO, G.; OLIVEIRA, R. M. C.; PEREIRA NETO, A. R. L.; GIL, J. N.; CARDOSO A. C. Odontogenic myxoma resection and prosthetic resolution - A clinical report. **International Journal of Stomatology & Occlusion Medicine**, v. 6, p. 70-72, 2013.

GIL, L. F.; SCHULDT FILHO, G.; DALAGO, H. R.; SOUZA, J. G. O.; FREITAS, S. T.; BIANCHINI, M. A. Relação entre extensão do cantilever e complicações biológicas em implantes distais de próteses totais fixas. **Full Dentistry in Science**, v. 5, p. 24-28, 2013.

DALAGO, H. R.; SCHULDT FILHO, G.; SOUZA, J. G. O.; BIANCHINI, M. A. Existe relação entre a doença peri-implantar e a manutenção oral periódica de consultório? **ImplantNews**, v. 10, p. 65-68, 2013.

BIANCHINI, M. A.; DALAGO, H. R.; SCHULDT FILHO, G.; BORTOLI JUNIOR, N.; SOUZA, J. G. O. Perda óssea peri-implantar: Fisiológica ou patológica? **Revista Catarinense de Implantodontia**, v. 13, p. 58-62, 2013.

DALAGO, H. R.; SOUZA, J. G. O.; SCHULDT FILHO, G.; OLIVEIRA, R. M. C.; BIANCHINI, M. A.; CARDOSO, A. C. Fatores que influenciam na fratura coronal em próteses totais fixas implantossuportadas. **Full Dentistry in Science**, v. 4, p. 108-111, 2012.

BIANCHINI, M. A.; SCHULDT FILHO, G.; SOUZA, J. G. O.; DALAGO, H. R.; SOUZA JR, J. M. Diagnóstico e tratamento das doenças peri-implantares. **Perionews**, v. 6, p. 540-546, 2012.

BIANCHINI, M. A.; SOUZA, J. G. O.; PEREIRA NETO, A. R. L.; BENFATTI, C. A. M.; SCHULDT FILHO, G.; SOUZA JR, J. M.; DALAGO, H. R.; MAGINI, R. S. Manutenção fisiológica da estética e função: Relato de caso. **Revista Catarinense de Implantodontia**, v. 12, p. 30-33, 2012.

4.2 ARTIGOS ACEITOS PARA PUBLICAÇÃO DURANTE O DOUTORADO

SCHULDT FILHO, G.; CABALLÉ-SERRANO, J.; SAWADA, K.; BOSSHARDT, D. D.; BIANCHINI, M. A.; BUSER, D.; GRUBER, R. Conditioned Medium of Demineralized Freeze-Dried Bone Activates Gene Expression in Periodontal Fibroblasts in Vitro. **Journal of Periodontology**, 2015.

BUTTENDORF, A. R.; DALAGO, H. R.; SOUZA, J. G. O.; SCHULDT FILHO, G.; FERREIRA, C. F.; BIANCHINI, M. A. Prevalence of peri-implant diseases: analyses of associated factors. **European Journal of Prosthodontics and Restorative Dentistry**, 2015.

DALAGO, H. R.; SCHULDT FILHO, G.; RODRIGUES, M. A. P.; RENVERT, S.; BIANCHINI, M. A. Risk Indicators for Peri-implantitis. A cross-sectional study with 916 implants. **Clinical Oral Implants Res.**, 2016.

4.3 CAPÍTULO DE LIVRO PUBLICADO DURANTE O DOUTORADO

BIANCHINI, M. A.; SCHULDT FILHO, G.; MELO, E. V. Tratamento cirúrgico das alterações peri-implantares. Alterações peri-implantares. 1ed. São Paulo: Santos Editora, 2014, v. 1, p. 89-164.

4.4 PARTICIPAÇÃO EM BANCAS DE MONOGRAFIA DE ESPECIALIZAÇÃO

ZANATTA, L. C. S.; SCHULDT FILHO, G.; MATUMOTO, E. K. Participação em banca de Andréa da Silveira Camargo. O uso de bisfosfanatos como fator limitante na utilização de implantes osseointegráveis, 2015. Monografia (Especialização em Implantologia Oral) - Universidade Paulista.

ZANATTA, L. C. S.; SCHULDT FILHO, G.; NOMIYAMA, L. M. Participação em banca de Luciana Pirani dos Santos Mattos. Análise retrospectiva da influência do histórico de doença periodontal na presença da peri-implantite, 2015. Monografia (Especialização em Implantologia Oral) - Universidade Paulista.

4.5 PARTICIPAÇÃO EM BANCA DE TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

MEZZOMO, L. A. M.; MAGINI, R. S.; SCHULDT FILHO, G. Participação em banca de Joaci Elias Honorato. Implantes curtos x Preenchimento do seio maxilar, 2014. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Odontologia) - Universidade Federal de Santa Catarina.

Capítulo V

APÊNDICE

5.1 APARELHOS UTILIZADOS PARA O PREPARO DAS AMOSTRAS



Figura 1: Exakt, Norderstedt, Germany. Equipamento utilizado para seccionar a mandíbula porcina.

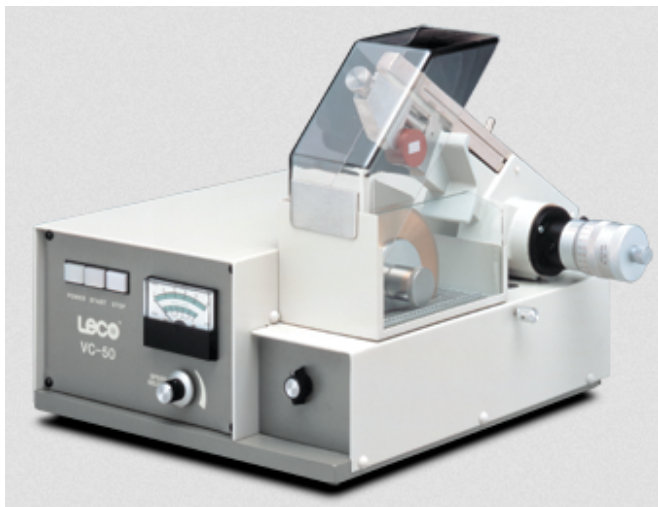


Figura 2: Varicut 50, Leco, St. Joseph, MI, USA. Equipamento utilizado para preparo das amostras com espessura de 3mm e 10mm de comprimento.



Figura 3: RC 10.22, Jouan, Saint-Herblain, France. Equipamento utilizado para liofilização das amostras com espessura de 3mm e 10mm de comprimento.



Figura 4: R. Quétin Bone-Mill, R. Quétin, Leimen, Germany. Equipamento utilizado para particular o osso liofilizado.

5.2 METODOLOGIA EXPANDIDA

O osso porcino foi obtido de um açougue local^{**} seis horas após o animal ter sido sacrificado, e mantido congelado (-20°C). Com o uso de uma serra diamantada,^{††} blocos corticais foram preparados utilizando-se apenas a tábua vestibular do osso. Assim, foram obtidos blocos corticalizados com 3mm de espessura e 10mm de comprimento.^{‡‡}

Após a obtenção das amostras com 3mm de espessura e 10mm de comprimento, a primeira etapa de tratamento consistiu no desengorduramento ou não do osso. Para isso, foi utilizado uma mistura contendo acetona e metanol (1:1). A etapa foi considerada concluída no momento em que o osso estivesse com aspecto liso de desengordurado. Após a finalização desta primeira etapa, dois grupos foram formados (desengordurados e não desengordurados).

Na sequência, os dois grupos (desengordurados e não desengordurados) foram submetidos à etapa de desmineralização com diferentes concentrações de ácido clorídrico (0.5M, 1M ou 2M) sob diferentes temperaturas (temperatura ambiente “TA” ou 4°C). A desmineralização foi considerada completa quando as amostras mostravam-se flexíveis. Além disso, o teste de coloração von Kossa (Figura 2) foi realizado para confirmar que as amostras estavam completamente desmineralizadas. O ácido residual foi eliminado com o uso de água destilada durante 30 minutos de lavagem vigorosa.

Na sequência, os blocos (3mm x 10mm) foram colocados em tubos Eppendorf para serem liofilizados^{§§}. A partir deste momento, as amostras estavam prontas para serem particuladas^{||}. Após a etapa de particulação, as amostras estavam prontas e a “matriz óssea desmineralizada” obtida.

Preparo do Meio Ósseo Condicionado e Desmineralizado (MOCD)

A matriz óssea desmineralizada (10%) foi colocada em meio contendo DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium), com 100U/ml de penicilina, 100µg/ml de estreptomicina e 0.25µg/ml de anfotericina.^{¶¶} Durante o período de 24 horas, o meio (10% de matriz óssea + DMEM) foi mantido em temperatura ambiente numa misturadora. Após transcorridas 24hs, o MOCD foi removido da misturadora, filtrado e mantido congelado (-20°C) em alíquotas. Antes do uso, as alíquotas eram devidamente descongeladas em água previamente aquecida. Para os grupos das amostras não desengorduradas, a extração dos lipídios foi devidamente realizada com o uso de metanol/clorofórmio.¹⁷ Assim, a

fração de lipídio foi removida para que sua influência sobre o meio condicionado fosse devidamente anulada. Para complementar os experimentos, o MOCD também foi obtido a partir de material alógeno já comercializado (putty^{##} e pó^{***}).

Células mesenquimais primárias e linhagens celulares

Fibroblastos gengivais e do ligamento periodontal foram obtidos a partir da coleta de tecido mole de dois doadores independentes durante a cirurgia de extração de terceiros molares. Ambos os pacientes estavam cientes da remoção e assinaram o termo livre de consentimento esclarecido previamente à coleta tecidual. O comitê de ética do Cantão de Berna aprovou o protocolo. A linhagem de células mesenquimais pré-osteoblásticas ST2 foi obtida a partir de um banco de células.^{†††} Todas as células foram cultivadas num ambiente umidificado (37°C) de meio de crescimento contendo DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium), soro fetal bovino 10% e antibióticos. As células foram semeadas em placas de cultura contendo meio de crescimento (30.000 células/cm²) e mantidas por 24 horas. Então, as células foram expostas à 20% de MOCD. Para o grupo controle, o meio de cultura livre de soro foi diluído no meio de crescimento.

O teste de viabilidade celular baseou-se na coloração Live/Dead (Figura 3).^{†††} A análise da expressão gênica foi realizada após 24 horas de incubação. A análise histoquímica da fosfatase alcalina em células ST2 foi realizada após 72 horas de incubação. Para os experimentos indicados, os seguintes inibidores farmacológicos seletivos foram utilizados: SB431542^{§§§} (inibidor seletivo de receptores TGF-β) e dois inibidores específicos de receptores de BMP tipo I: Dorsomorfina e LDN193189, os quais inibem principalmente ALK2 e ALK3 mas também ALK4, ALK5, e ALK7. A utilização dos inibidores fez-se necessária para avaliar se as alterações gênicas estavam sendo mediadas via receptores de BMP's ou via receptores de TGF-β.

Análise da transcrição reversa quantitativa - reação em cadeia da polimerase (PCR)

Para a análise da expressão gênica, o RNA celular foi isolado.ⁱⁱⁱ A transcrição reversa foi realizada com o cDNA master mix,^{¶¶¶} e a reação em cadeia da polimerase (PCR) foi feita com o green master mix^{####} em um sistema de PCR em tempo real.^{****} Os genes analisados foram

hADM:	GGACATGAAGGGTGCCTCTC-
-------	-----------------------

TGTTTCATGCTCTGGCGGTAG; hPTX3:
 TGTATGTGAATTTGGACAACGAA -
 CATTCCGAGTGCTCCTGAC; hBTBD11:
 CAAAGCACTCCTCTCCAGCA - AATGAGCAGTGACTCTGGGC;
 hIL11: TGCACCTGACACTTGACTGG -
 AGTCTTCAGCAGCAGCAGTC; hNOX4:
 TCTTGGCTTACCTCCGAGGA - CTCCTGGTTCTCCTGCTTGG;
 hKANK4: GAACCGAGGAACTGG - CCTCTTCCTGCTGCT; e hβ-
 actina: CCAACCGCGAGAAGATGA -
 CCAGAGGCGTACAGGGATAG. Os níveis de mRNA foram
 calculados após a normalização com o gene-referência β-actina
 utilizando-se o método de ciclo comparativo.

Fosfatase alcalina

Para análise histoquímica da fosfatase alcalina, células pré-osteoblásticas da linhagem ST2 foram fixadas e incubadas em uma solução contendo naftol AS-TR fosfato e sal diazônico (fast blue BB).^{††††} Após lavagem com água destilada, as culturas foram fotografadas.^{††††18}

Análises estatísticas

Todos os experimentos foram realizados em duplicatas ou triplicatas. Os dados foram reportados como médias +/- desvio padrão. O teste t pareado foi utilizado em experimentos com variação de temperatura (desengorduramento versus não-desengorduramento a 4°C ou temperatura ambiente). A análise de variância foi usada para comparar as três concentrações de ácido clorídrico. A significância estatística foi estabelecida como $P < 0.05$.